



Spis treści

II Akty o charakterze nieustawodawczym

ROZPORZĄDZENIA

- ★ Rozporządzenie Komisji (UE) 2016/266 z dnia 7 grudnia 2015 r. zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego, rozporządzenie (WE) nr 440/2008 ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) ⁽¹⁾ 1

⁽¹⁾ Tekst mający znaczenie dla EOG

II

(Akty o charakterze nieustawodawczym)

ROZPORZĄDZENIA

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) 2016/266

z dnia 7 grudnia 2015 r.

zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego, rozporządzenie (WE) nr 440/2008 ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH), utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 13 ust. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 440/2008 ⁽²⁾ zawiera metody badań służące określaniu właściwości fizykochemicznych, toksyczności oraz ekotoksyczności chemikaliów, które to metody należy stosować do celów rozporządzenia (WE) nr 1907/2006.
- (2) Należy uaktualnić rozporządzenie (WE) nr 440/2008 w celu uwzględnienia nowych i zaktualizowanych metod badawczych przyjętych niedawno przez OECD, w celu uwzględnienia postępu technicznego oraz zmniejszenia liczby zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych zgodnie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE ⁽³⁾. W sprawie projektu tej aktualizacji przeprowadzono konsultacje z zainteresowanymi stronami.
- (3) Aktualizacja zawiera dwadzieścia metod badań: jedną nową metodę określenia właściwości fizykochemicznych, jedenaście nowych metod i trzy zaktualizowane metody badań do celów oceny ekotoksyczności oraz pięć nowych metod badań do celów oceny losów i zachowania w środowisku.
- (4) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (WE) nr 440/2008.
- (5) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Komitetu ustanowionego na mocy art. 133 rozporządzenia (WE) nr 1907/2006,

⁽¹⁾ Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 440/2008 z dnia 30 maja 2008 r. ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) (Dz.U. L 142 z 31.5.2008, s. 1).

⁽³⁾ Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie trzeciego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 7 grudnia 2015 r.

W imieniu Komisji
Jean-Claude JUNCKER
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 wprowadza się następujące zmiany:

- 1) na początku załącznika, przed częścią A, dodaje się uwagę:

„Uwaga:

Przed zastosowaniem którejkolwiek z poniższych metod badawczych w celu zbadania substancji wieloskładnikowej, substancji o nieznanym lub zmiennym składzie, złożonego produktu reakcji lub materiału biologicznego (UVCB), lub mieszaniny oraz w przypadkach, gdy zastosowanie metody badawczej do badania substancji wieloskładnikowej, UVCB lub mieszaniny nie zostało określone w danej metodzie badawczej, należy rozważyć, czy dana metoda jest adekwatna do zamierzonego celu regulacyjnego.

Jeżeli daną metodą badawczą stosuje się do badania substancji wieloskładnikowej, UVCB lub mieszaniny, należy w miarę możliwości udostępnić wystarczające informacje na temat jej składu, np. nazwę chemiczną jej składników, ich ilości oraz istotne właściwości jej składników.”;

- 2) dodaje się rozdział A.24 w brzmieniu:

„A.24. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU (N-OKTANOL/WODA), METODA WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOLOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 117 (2004).

1. Współczynnik podziału (P) definiuje się jako stosunek stężeń (C) w stanie równowagi substancji rozpuszczonej w układzie dwufazowym, składającym się z dwóch zasadniczo niemieszających się ze sobą rozpuszczalników. W przypadku n-oktanolu i wody:

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

Współczynnik podziału będący ilorazem dwóch stężeń jest bezwymiarowy i na ogół podaje się go w postaci jego logarytmu o podstawie 10.

2. P_{ow} jest kluczowym parametrem w badaniach wpływu substancji chemicznych na środowisko. Wykazano, że istnieje bardzo istotna zależność między P_{ow} niezjonizowanej postaci substancji a bioakumulacją tych substancji w rybach. Wykazano również, że P_{ow} jest przydatnym parametrem do celów przewidywania adsorpcji na glebie i osadach oraz ustalania ilościowych zależności struktura-aktywność dla szerokiego zakresu skutków biologicznych.
3. Pierwotna propozycja dotycząca tej metody badawczej opierała się na artykule autorstwa C.V. Eadsforth i P. Moser (1). Agencja Umweltbundesamt Republiki Federalnej Niemiec koordynowała w 1986 r. opracowywanie metody badawczej oraz międzylaboratoryjne badanie porównawcze (2).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

4. Wartości logarytmu P_{ow} w przedziale – 2–4 (niekiedy do 5 i więcej) ⁽¹⁾ można określić doświadczalnie za pomocą metody wstrząsania kolby (rozdział A.8 niniejszego załącznika, dotycząca badań wytyczna OECD nr 107). Metoda HPLC obejmuje logarytm P_{ow} w przedziale od 0 do 6 (1)(2)(3)(4)(5). Metoda ta może wymagać oszacowania P_{ow} w celu przypisania odpowiednich substancji odniesienia i poparcia wszelkich wniosków wyciągniętych na podstawie danych wygenerowanych w ramach badania. Metody obliczania omówiono krótko w dodatku do niniejszej metody badawczej. Tryb działania HPLC ma charakter izokratyczny.
5. Wartości P_{ow} zależą od warunków otoczenia, takich jak temperatura, pH, moc jonowa itp., i należy je zdefiniować w eksperymencie, aby umożliwić poprawną interpretację danych P_{ow} . W przypadku substancji podatnych na dysocjację dostępna może stać się inna metoda (np. projekt wytycznej OECD dotyczącej metody pH-metrycznej dla substancji jonowych (6)) i można ją będzie zastosować jako metodę alternatywną. Mimo że wspomniany projekt wytycznej OECD może być właściwy do ustalenia P_{ow} odniesieniu do tych substancji podatnych na dysocjację, w niektórych przypadkach bardziej odpowiednie jest zastosowanie metody HPLC przy pH występującym w środowisku naturalnym (zob. pkt 9).

⁽¹⁾ Górną granicę stosuje się z uwagi na konieczność uzyskania fazy kompletnego rozdzielania po dostosowaniu równowagi podziału i przed pobraniem próbek do oznaczeń analitycznych. Przy zachowaniu należytej dbałości górną granicę można podnieść do wyższych wartości P_{ow} .

ZASADA METODY

6. Metoda HPLC w układzie faz odwróconych jest wykonywana na kolumnach analitycznych wypełnionych dostępną na rynku fazą stałą zawierającą długocząsteczkowe węglowodory (np. C8, C18) chemicznie związane na krzemionce.
7. Substancja chemiczna wstrzyknięta do takiej kolumny rozdziela się na rozpuszczalnikową fazę ruchomą i węglowodórą fazę stacjonarną, w miarę jak jest transportowana w kolumnie przez fazę ruchomą. Substancje są zatrzymywane proporcjonalnie do ich współczynnika podziału węglowodór-woda, przy czym pierwsze są wymywane substancje hydrofilowe, a ostatnie – substancje lipofilowe. Czas retencji opisuje się jako współczynnik retencji k podany za pomocą wyrażenia:

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

gdzie t_R oznacza czas retencji substancji badanej, a t_0 oznacza czas martwy, tj. średni czas przejścia cząsteczki rozpuszczalnika przez kolumnę. Nie są wymagane analizy ilościowe, konieczne jest tylko oznaczenie czasu retencji.

8. Współczynnik podziału oktanol/woda substancji badanej można obliczyć poprzez doświadczalne określenie jego współczynnika retencji k , a następnie wprowadzenie k do następującego równania:

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

gdzie

a, b = współczynniki regresji liniowej.

Powyższe równanie można również uzyskać, przeprowadzając regresję liniową logarytmu współczynników podziału oktanol/woda substancji odniesienia w odniesieniu do logarytmu współczynników retencji substancji odniesienia.

9. Metoda HPLC w układzie faz odwróconych fazami umożliwia oszacowanie współczynników podziału w logarytmie P_{ow} w przedziale od 0 do 6, ale w wyjątkowych przypadkach można ją rozszerzyć tak, aby objęła logarytm P_{ow} w przedziale od 6 do 10. Może to wymagać modyfikacji fazy ruchomej (3). Metoda ta nie ma zastosowania do mocnych kwasów i zasad, związków kompleksowych metali, substancji, które reagują z eluentem ani do środków powierzchniowo czynnych. Pomiaru można wykonywać na substancjach podatnych na dysocjację w ich niejonizowanej postaci (wolny kwas lub wolna zasada) jedynie poprzez zastosowanie odpowiedniego roztworu buforowego o pH poniżej pK_a dla wolnego kwasu lub powyżej pK_a dla wolnej zasady. Alternatywnie, do badania substancji podatnych na dysocjację dostępna może być metoda pH-metryczna (6) i można ją zastosować jako metodę alternatywną (6). Jeżeli wartość logarytmu P_{ow} określa się w celu zastosowania w klasyfikacji zagrożeń dla środowiska lub w ocenie ryzyka środowiskowego, badanie należy przeprowadzić w przedziale pH odpowiednim dla środowiska naturalnego, tj. w przedziale pH 5,0–9.
10. W niektórych przypadkach zanieczyszczenia mogą utrudnić interpretację wyników z uwagi na niepewność pomiaru przy wyznaczaniu piku. Dla mieszanin dających nierozdzielone pasmo należy podać górną i dolną granicę logarytmu P_{ow} oraz powierzchnię procentową każdego piku logarytmu P_{ow} . Dla mieszanin będących grupami homologów należy również podać średnią ważoną logarytmu P_{ow} (7), obliczoną w oparciu o pojedyncze wartości P_{ow} i odpowiadające im wartości powierzchni procentowej (8). W obliczeniach należy uwzględnić wszystkie piki mające powierzchnię 5 % lub większą w ramach całkowitej powierzchni piku (9):

$$\text{średnia ważona } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi}) (\text{powierzchnia } \%)}{\text{całkowita powierzchnia pików } \%} = \frac{\sum_i (\log P_{owi}) (\text{powierzchnia } \%_i)}{\sum_i \text{powierzchnia } \%}$$

Logarytm P_{ow} średniej ważonej jest ważny jedynie dla substancji lub mieszanin (np. olej talowy) składających się z homologów (np. serii alkanów). Można wykonać pomiary mieszanin dające konkretne wyniki, pod warunkiem że czułość zastosowanego detektora analitycznego jest taka sama w odniesieniu do wszystkich substancji w mieszaninie i że mogą one zostać odpowiednio rozdzielone.

INFORMACJE NA TEMAT SUBSTANCJI BADANEJ

11. Przed zastosowaniem metody powinny być znane stała dysocjacji, wzór strukturalny oraz rozpuszczalność w fazie ruchomej. Dodatkowo przydatne byłyby informacje na temat hydrolizy.

KRYTERIA JAKOŚCI

12. W celu zwiększenia zaufania do pomiarów trzeba wykonywać po dwa oznaczenia.
- Powtarzalność: wartość logarytmu P_{ow} uzyskana z wielokrotnych pomiarów wykonanych w identycznych warunkach i z zastosowaniem tego samego zestawu substancji odniesienia powinna mieścić się w zakresie $\pm 0,1$ jednostki logarytmicznej.
 - Odtwarzalność: jeżeli pomiary powtarza się z zastosowaniem innego zestawu substancji odniesienia, wyniki mogą się różnić. Zwykle współczynnik korelacji R dla zależności między logarytmem k a logarytmem P_{ow} dla zestawu substancji badanych wynosi około 0,9, co odpowiada współczynnikowi podziału oktanol/woda logarytmu P_{ow} wynoszącemu $+ 0,5$ jednostki logarytmicznej.
13. Z międzylaboratoryjnego badania porównawczego wynika, że można uzyskać wartości logarytmu P_{ow} metodą HPLC w zakresie $+ 0,5$ jednostki wartości w ramach metody wstrząsania kolby (2). Inne porównania można znaleźć w literaturze przedmiotu (4)(5)(10)(11)(12). Wykres korelacji oparty na strukturalnie powiązanych substancjach odniesienia daje najdokładniejsze wyniki (13).

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

14. W celu skorelowania zmierzonego współczynnika retencji k danej substancji z jego P_{ow} trzeba ustalić wykres kalibracyjny z zastosowaniem co najmniej sześciu punktów (zob. pkt 24). Użytkownik może wybrać odpowiednie substancje odniesienia. Wartości logarytmu P_{ow} substancji odniesienia zwykle powinny obejmować logarytm P_{ow} substancji badanej, tj. P_{ow} co najmniej jednej substancji odniesienia powinien być wyższy niż substancji badanej, a P_{ow} innej substancji powinien być niższy niż substancji badanej. Ekstrapolację należy stosować wyłącznie w wyjątkowych przypadkach. Pożądane jest, aby przedmiotowe substancje odniesienia były strukturalnie powiązane z substancją badaną. Wartości logarytmu P_{ow} substancji odniesienia zastosowanych do kalibracji powinny opierać się na wiarygodnych danych doświadczalnych. Dla substancji o wysokim logarytmie P_{ow} (zwykle powyżej 4) można wykorzystać obliczone wartości, chyba że dostępne są wiarygodne dane doświadczalne. Jeżeli korzysta się z wartości ekstrapolowanych, należy podać wartość graniczną.
15. Rozszerzone wykazy wartości logarytmu P_{ow} dla wielu grup substancji chemicznych są dostępne w pozycjach bibliograficznych (14) i (15). Jeżeli dane współczynników podziału strukturalnie powiązanych substancji nie są dostępne, można zastosować bardziej ogólną kalibrację ustaloną w oparciu o inne substancje odniesienia. Zalecane substancje odniesienia oraz ich wartości P_{ow} wymieniono w tabeli 1. Dla substancji podatnych na dysocjację podane wartości mają zastosowanie do niezjonizowanej postaci. Wartości skontrolowano pod kątem wiarygodności i jakości podczas międzylaboratoryjnego badania porównawczego.

Tabela 1

Zalecane substancje odniesienia

	Numer CAS	Substancja odniesienia	logarytm P_{ow}	stała dysocjacji (pKa)
1	78-93-3	2-butanon Keton metylowo-etylowy	0,3	
2	1122-54-9	4-acetylopirydyna	0,5	
3	62-53-3	Anilina	0,9	
4	103-84-4	Acetanilid	1,0	
5	100-51-6	Alkohol benzyłowy	1,1	
6	150-76-5	4-metoksyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Kwas fenoksyoctowy	1,4	pKa = 3,12

	Numer CAS	Substancja odniesienia	logarytm P_{ow}	stała dysocjacji (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	Benzonitryl	1,6	
11	140-29-4	Fenylacetonytryl	1,6	
12	589-18-4	Alkohol 4-metylobenzylowy	1,6	
13	98-86-2	Acetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	Kwas 3-nitrobenzoesowy	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-chloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzen	1,9	
18	104-54-1	Alkohol cynamyłowy (Alkohol cynamonowy)	1,9	
19	65-85-0	Kwas benzoesowy	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	P-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Kwas cynamonowy	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anizol	2,1	
23	93-58-3	Benzoesan metylu	2,1	
24	71-43-2	Benzen	2,1	
25	99-04-7	Kwas 3-metylobenzoesowy	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-chlorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Tróchloroetylen	2,4	
28	1912-24-9	Atrazyna	2,6	
29	93-89-0	Benzoesan etylu	2,6	
30	1194-65-6	2,6-dichlorobenzonitryl	2,6	
31	535-80-8	Kwas 3-chlorobenzoesowy	2,7	pKa = 3,82

	Numer CAS	Substancja odniesienia	logarytm P_{ow}	stała dysocjacji (pKa)
32	108-88-3	Toluen	2,7	
33	90-15-3	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dichloroanilina	2,8	
35	108-90-7	Chlorobenzen	2,8	
36	1746-13-0	Eter allilowo-fenyłowy	2,9	
37	108-86-1	Bromobenzen	3,0	
38	100-41-4	Etylobenzen	3,2	
39	119-61-9	Benzofenon	3,2	
40	92-69-3	4-fenylofenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Tymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-dichlorobenzen	3,4	
43	122-39-4	Difenyloamina	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalen	3,6	
45	93-99-2	Benzoesan fenylu	3,6	
46	98-82-8	Izopropylobenzen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trichlorofenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenył	4,0	
49	120-51-4	Benzoesan benzylu	4,0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-sec-butylofenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-trichlorobenzen	4,2	
52	143-07-7	Kwas dodekanowy	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Eter difenyłowy	4,2	
54	85-01-8	Fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-butylobenzen	4,6	

	Numer CAS	Substancja odniesienia	logarytm P_{ow}	stała dysocjacji (pKa)
56	103-29-7	Dibenzyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenylopirydyna	4,9	
58	206-44-0	Fluoranten	5,1	
59	603-34-9	Trifenyloamina	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

OPIS METODY

Wstępne oszacowanie współczynnika podziału

16. W razie konieczności współczynnik podziału substancji badanej można oszacować, najlepiej stosując metodę obliczania (zob. dodatek) lub, w stosownych przypadkach, wykorzystując stosunek rozpuszczalności substancji badanej w czystych rozpuszczalnikach.

Aparatura

17. Wymagany jest chromatograf cieczowy wyposażony w niskociśnieniową pompę i odpowiedni system detekcji. Do wielu różnorodnych grup substancji chemicznych ma zastosowanie detektor UV wykorzystujący długość fali wynoszącą 210 nm lub detektor współczynnika załamania światła. Obecność grup polarnych w fazie stacjonarnej może poważnie zakłócić działanie kolumny HPLC. W związku z tym fazy stacjonarne powinny posiadać minimalną zawartość grup polarnych (16). Można stosować dostępne na rynku mikrocząsteczkowe wypełnienie dla fazy odwróconej lub gotowe wypełnione kolumny. Kolumna osłonowa może być umieszczona między systemem dozowania a kolumną analityczną.

Faza ruchoma

18. Do przygotowania eluentu, który zostaje odgazowany przed użyciem, stosuje się metanol do HPLC oraz wodę destylowaną lub dejonizowaną. Wykorzystuje się elucję izokratyczną. Należy stosować stosunki metanol/woda o minimalnej zawartości wody 25 %. Mieszanina metanol-woda o typowym stosunku 3:1 (obj.) jest zadowalająca do wymywania związków o logarytmie P 6 w ciągu jednej godziny, przy szybkości przepływu 1 ml/min. Dla substancji o logarytmie P powyżej 6 może być konieczne skrócenie czasu elucji (oraz czasów elucji substancji odniesienia) poprzez zmniejszenie polarności fazy ruchomej lub długości kolumny.
19. Substancja badana i substancje odniesienia muszą być rozpuszczalne w fazie ruchomej w stężeniu umożliwiającym ich wykrycie. Tylko w wyjątkowych przypadkach można zastosować dodatki do mieszaniny metanol-woda, ponieważ dodatki zmieniają właściwości kolumny. W takich przypadkach trzeba potwierdzić, że nie ma to wpływu na czas retencji substancji badanych ani substancji odniesienia. Jeżeli układ metanol-woda nie jest odpowiedni, można użyć innych mieszanin rozpuszczalników organicznych z wodą, na przykład etanol-woda, acetonitryl-woda lub alkohol izopropylowy (propan-2-ol)-woda.
20. Wartość pH eluentu ma znaczenie krytyczne dla substancji podatnych na dysocjację. Powinna ona znajdować się w zakresie roboczym pH kolumny, który zwykle wynosi 2–8. Zalecane jest buforowanie. Należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do strącania się soli i zniszczenia kolumny, co zachodzi w przypadku niektórych mieszanin fazy organicznej i roztworu buforowego. Pomiar HPLC w przypadku faz stacjonarnych opartych na krzemionce powyżej pH 8 nie są zwykle zalecane, gdyż użycie zasadowej fazy ruchomej może powodować gwałtowne pogorszenie się wydajności kolumny.

Substancje rozpuszczone

21. Substancje badane i substancje odniesienia muszą być wystarczająco czyste, aby można było przypisać piki w chromatogramach do odpowiednich substancji. Substancje używane do celów badania lub kalibracji są rozpuszczone, o ile to możliwe, w fazie ruchomej. Jeżeli do rozpuszczania substancji badanej i substancji odniesienia stosuje się rozpuszczalnik inny niż faza ruchoma, fazę ruchomą należy zastosować do ostatecznego rozpuszczenia przed wstrzyknięciem.

Warunki badania

22. Temperatura w trakcie wykonywania pomiarów nie może zmieniać się o więcej niż $\pm 1^\circ\text{C}$.

Oznaczenie czasu martwego t_0

23. Czas martwy t_0 można obliczyć, wykorzystując niezwiązane substancje organiczne (np. tiomocznik lub formamid). Bardziej precyzyjny czas martwy można uzyskać na podstawie zmierzonych czasów retencji lub zestawu około siedmiu członów szeregu homologicznego (np. n-alkilometyloketonów) (17). Czasy retencji $t_R(n_C + 1)$ są wykreślane w funkcji $t_R(n_C)$, gdzie n_C oznacza liczbę atomów węgla. Uzyskuje się linię prostą, $t_R(n_C + 1) = A t_R(n_C) + (1 - A)t_0$, gdzie A odpowiadające $k(n_C + 1)/k(n_C)$ jest stałe. Czas martwy t_0 uzyskuje się na podstawie punktu przecięcia $(1 - A)t_0$ oraz nachylenia A .

Równanie regresji

24. Następnym krokiem jest wykreślenie korelacji logarytmu k w odniesieniu do logarytmu P dla właściwych substancji odniesienia o wartościach logarytmu P zbliżonych do wartości spodziewanych dla substancji badanej. W praktyce wstrzykuje się jednocześnie 6–10 substancji odniesienia. Oznacza się czasy retencji, najlepiej przez integrator rejestrujący podłączony do systemu detekcji. Odpowiadające logarytmy współczynników retencji, logarytm k , są wykreślane w funkcji logarytmu P . Równanie regresji jest wykonywane w regularnych odstępach czasu, co najmniej raz dziennie, tak aby możliwe zmiany wydajności kolumny mogły być uwzględniane.

OZNACZANIE P_{ow} SUBSTANCJI BADANEJ

25. Substancja badana jest wstrzykiwana w najmniejszych wykrywalnych ilościach. Czas retencji oznacza się podwójnie. Współczynnik podziału substancji badanej uzyskuje się poprzez interpolację obliczonego współczynnika retencji na wykresie kalibracyjnym. Dla bardzo niskich oraz dla bardzo wysokich współczynników podziału konieczna jest ekstrapolacja. Szczególnie w tych przypadkach trzeba zwrócić uwagę na granice ufności linii regresji. Jeżeli czas retencji próby wykracza poza zakres czasów retencji uzyskanych z norm, należy podać wartość graniczną.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**Sprawozdanie z badania**

26. Sprawozdanie musi zawierać następujące dane:

- wstępne oszacowanie współczynnika podziału, jeżeli jest oznaczony, szacowane wartości i zastosowaną metodę; a jeżeli zastosowano metodę obliczania – jej pełny opis, w tym określenie bazy danych i szczegółowe informacje na temat wyboru fragmentów;
- substancje badane i substancje odniesienia: czystość, wzór strukturalny i numer CAS;
- opis wyposażenia i warunki pracy: kolumna analityczna, kolumna osłonowa;
- fazę ruchomą, sposoby wykrywania, zakres temperatur, pH;
- profile elucji (chromatogramy);
- czas martwy i sposób jego pomiaru;
- dane retencji oraz literaturowe wartości logarytmu P_{ow} dla substancji odniesienia użytych w kalibracji;
- szczegółowe informacje na temat dopasowania linii regresji (logarytm k w odniesieniu do logarytmu P_{ow}) oraz współczynnik korelacji linii, w tym przedziały ufności;
- dane średniej retencji i interpolowaną wartość logarytmu P_{ow} substancji badanej;
- w przypadku mieszanin: chromatogram profilu elucji z zaznaczonymi wartościami granicznymi;

- wartości logarytmu P_{ow} dotyczące zakresu procentowego piku logarytmu P_{ow} ;
- obliczenie z zastosowaniem linii regresji;
- w stosownych przypadkach obliczoną średnią ważoną wartości logarytmu P_{ow} .

BIBLIOGRAFIA

- (1) C.V. Eadsforth i P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
- (2) W. Klein, Kördel, M. Weiss i 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 i 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. Projekt wytycznej, listopad 2000 r.
- (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), załącznik 10, Oviedo, 20–24 lutego 1995 r.
- (8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez i C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Wersja 1.0, 3. Sierpień.
- (9) E. A. Vik, S. Bakke i K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. *Environmental Modelling & Software*, tom 13, s. 529–537.
- (10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem i 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 i 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. J. E. Haky i 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 i 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 i A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Wiley, Nowy Jork.

-
- (15) C. Hansch, przewodniczący; A.J. Leo, dyr. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity – udostępnione w ramach Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, Kalifornia 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, i J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromato.* 3, 1669.
-

Dodatek

Metody obliczania P_{ow}

WPROWADZENIE

1. W niniejszym dodatku przedstawiono krótkie wprowadzenie do obliczania P_{ow} . Dalsze informacje czytelnik może znaleźć w podręcznikach (1)(2).
2. Obliczone wartości P_{ow} wykorzystuje się do:
 - określania, którą metodę eksperymentalną należy zastosować: metodę wstrząsania kolby dla logarytmu P_{ow} wynoszącego – 2–4 oraz metodę HPLC dla logarytmu P_{ow} wynoszącego 0–6;
 - wybierania warunków, które mają być zastosowane w HPLC (substancje odniesienia, stosunek metanol/woda);
 - sprawdzania wiarygodności wartości uzyskanych dzięki metodom eksperymentalnym;
 - przedstawiania szacunków, w przypadku gdy nie można zastosować metod eksperymentalnych.

Zasada metod obliczania

3. Proponowane tutaj metody obliczania są oparte na teoretycznej fragmentacji cząsteczki na odpowiednie podstruktury, dla których znane są wiarygodne przyrosty logarytmu P_{ow} . Logarytm P_{ow} uzyskuje się poprzez zsumowanie wartości fragmentów i współczynników korygujących dla oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych. Dostępne są wykazy stałych fragmentu cząsteczki i współczynników korygujących (1)(2)(3)(4)(5)(6). Niektóre są regularnie aktualizowane (3).

Wiarygodność obliczonych wartości

4. Zasadniczo wiarygodność metod obliczania obniża się wraz ze wzrostem złożoności badanej substancji. W przypadku prostych cząsteczek o niskiej masie cząsteczkowej i jednej lub dwóch grupach funkcyjnych można oczekiwać odchylenia 0,1–0,3 jednostek logarytmu P_{ow} między wynikami różnych metod fragmentacji a wartościami pomiarowymi. Margines błędu będzie zależał od wiarygodności zastosowanych stałych fragmentu cząsteczki, zdolności rozpoznania oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych (np. wiązań wodorowych) oraz poprawnego zastosowania współczynników korygujących. W przypadku substancji jonizujących należy uwzględnić ładunek i stopień jonizacji (10).

 π -metoda Fujity-Hanscha

5. Stała podstawienia hydrofobowego, π , pierwotnie wprowadzona przez Fujitę i in. (7), jest zdefiniowana jako:

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

gdzie PhX oznacza pochodną aromatyczną, a PhH substancję macierzystą.

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

π -metoda jest przedmiotem szczególnego zainteresowania w przypadku substancji aromatycznych. Dostępne są π -wartości dla dużej liczby podstawników (4)(5).

Metoda Rekkera

6. Stosując metodę Rekkera (8), wartość logarytmu P_{ow} oblicza się jako:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{składniki oddziaływań})$$

gdzie a_i oznacza liczbę przypadków, gdy dany fragment występuje w cząsteczce, a f_i oznacza przyrost logarytmu P_{ow} fragmentu. Składniki oddziaływań można wyrazić jako całkowitą wielokrotność pojedynczej stałej C_m (tak zwaną »stałą magiczną«). Stałe fragmentu cząsteczki f_i oraz C_m zostały ustalone na podstawie wykazu 1 054 doświadczalnych wartości P_{ow} dla 825 substancji poprzez zastosowanie wielokrotnej analizy regresji (6)(8). Oznaczenie składników oddziaływań przeprowadza się zgodnie z wyznaczonymi zasadami (6)(8) (9).

Metoda Hansch-Leo

7. Stosując metodę Hanscha i Leo (4), wartość logarytmu P_{ow} oblicza się jako:

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

gdzie f_i oznacza stałą fragmentu cząsteczki, F_j oznacza współczynnik korygujący, a_i i b_j oznaczają odpowiadającą częstotliwość występowania. Wykazy atomowych i grupowych wartości fragmentów oraz współczynniki korygujące F_j uzyskano metodą prób i błędów z doświadczalnych wartości P_{ow} . Współczynniki korygujące podzielono na kilka różnych klas (1)(4). Opracowano pakiety oprogramowania, aby uwzględnić wszystkie zasady i współczynniki korygujące (3).

METODA POŁĄCZONA

8. Obliczanie logarytmu P_{ow} złożonych cząsteczek można znacząco poprawić, jeżeli cząsteczkę dzieli się na większe podstruktury, dla których dostępne są wiarygodne wartości logarytmu P_{ow} na podstawie tabeli (3)(4) albo na podstawie istniejących pomiarów. Takie fragmenty (np. heterocykle, antrachinon, azobenzen) mogą być potem połączone z wartościami π -Hanscha lub ze stałymi fragmentu cząsteczki Rekkera lub Leo.

Uwagi

- (i) Metody obliczania mają zastosowanie tylko do substancji zjonizowanych częściowo lub w całości, w przypadku gdy uwzględniono niezbędne współczynniki korygujące.
- (ii) Jeżeli można założyć, że istnieją wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, trzeba dodać odpowiadające współczynniki korygujące (od około + 0,6 do + 1,0 jednostki logarytmu P_{ow}) (1). Wskazania dotyczące występowania takich wiązań można uzyskać z modeli przestrzennych lub danych spektroskopowych.
- (iii) Jeżeli możliwe jest występowanie kilku postaci tautomerycznych, podstawą do obliczeń powinna być najbardziej prawdopodobna postać.
- (iv) Należy starannie prowadzić weryfikacje wykazów stałych fragmentu cząsteczki.

BIBLIOGRAFIA Z ZAKRESU METOD OBLICZANIA

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl i D. H. Rosenblatt (red.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, Nowy Jork (1982).
- (2) W.J. Dunn, J.H. Block i R. S. Pearlman (red.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (Nowy Jork) i Oxford (1986).
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, Kalifornia 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (4) C. Hansch i A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, Nowy Jork (1979).
- (5) Leo, C. Hansch i 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 i 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*, tom 1, Elsevier, Nowy Jork (1977).
- (9) C.V. Eadsforth i P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
- (10) R.A. Scherrer. ACS – Symposium Series 255, s. 225, Amerykańskie Towarzystwo Chemiczne, Waszyngton, D.C. (1984).”;

3) rozdział C.3 otrzymuje brzmienie:

„C.3. BADANIE ZAHAMOWANIA WZROSTU SŁODKOWODNYCH GLONÓW I CYJANOBAKTERII

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 201 (2006, załącznik skorygowany w 2011). Stwierdzono potrzebę rozszerzenia zakresu tej metody badawczej, tak aby objąć nią dodatkowe gatunki i zaktualizować ją, by spełniała wymagania w zakresie oceny zagrożenia oraz klasyfikacji substancji chemicznych. Korekty dokonano na podstawie szerokich doświadczeń praktycznych, postępu naukowego w dziedzinie badań nad toksycznością glonów oraz rozległego zastosowania regulacyjnego, które nastąpiło od czasu pierwotnego przyjęcia.
2. Zastosowane definicje są podane w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

3. Celem niniejszego badania jest określenie wpływu substancji chemicznej na wzrost słodkowodnych mikroglonów lub cyjanobakterii. Użyte do badania rosnące wykładniczo organizmy naraża się na działanie badanej substancji chemicznej w kulturach statycznych przez okres wynoszący zwykle 72 godziny. Pomimo stosunkowo krótkiego czasu trwania badania, skutki można ocenić na przestrzeni kilku pokoleń.
4. Reakcja układu polega na ograniczeniu wzrostu w szeregu kultur glonów (badanych jednostek) narażonych na działanie różnych stężeń badanej substancji chemicznej. Reakcję ocenia się jako funkcję stężenia ekspozycyjnego w odniesieniu do średniego wzrostu kultur w kontrpróbach kontrolnych niepoddanych narażeniu. W celu pełnego wyrażenia reakcji układu na skutki toksyczne (dla zapewnienia optymalnej wrażliwości) kulturom umożliwia się nieograniczony wzrost wykładniczy w dostatecznych warunkach odżywczych i przy stałym świetle przez okres wystarczający do pomiaru zmniejszenia właściwej szybkości wzrostu.
5. Wzrost i zahamowanie wzrostu określa się ilościowo poprzez pomiary biomasy glonów w funkcji czasu. Biomasa glonów określa się jako suchą masę przypadającą na objętość, np. mg glonów/litr roztworu do badań. Sucha masa jest jednak trudna do zmierzenia i w związku z tym używa się parametrów zastępczych. Ze wspomnianych parametrów zastępczych najczęściej używa się liczby komórek. Do innych takich parametrów należy objętość komórek, fluorescencja, gęstość optyczna itp. Należy znać przelicznik pomiędzy mierzonym parametrem zastępczym a biomasa.
6. Punktem końcowym badania jest zahamowanie wzrostu wyrażone jako logarytmiczny przyrost biomasy (średnia właściwa szybkość wzrostu) w okresie narażenia. Na podstawie średniej właściwej szybkości wzrostu zarejestrowanej w serii roztworów do badań wyznacza się stężenie powodujące zahamowanie szybkości wzrostu o określoną wartość procentową (np. 50 %) i wyraża się je jako $E_r C_x$ (np. $E_r C_{50}$).
7. Dodatkową zmienną zależną użytą w niniejszej metodzie badawczej jest przyrost, który może być potrzebny do spełnienia określonych wymagań regulacyjnych w niektórych krajach. Jest on określony jako biomasa na końcu okresu narażenia minus biomasa na początku okresu narażenia. Na podstawie uzysku zarejestrowanego w serii roztworów do badań oblicza się stężenie powodujące zahamowanie przyrostu o określone x % (np. 50 %) i wyraża się je jako $E_y C_x$ (np. $E_y C_{50}$).

8. Ponadto można statystycznie określić najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), oraz stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

9. Informacje na temat badanej substancji chemicznej, które mogą być przydatne przy ustalaniu warunków badania, obejmują wzór strukturalny, czystość, stabilność w świetle, stabilność w warunkach badania, właściwości pochłaniania światła, stałą dysocjacji oraz wyniki badań przemiany, w tym biodegradowalność w wodzie.
10. Należy znać rozpuszczalność w wodzie, współczynnik podziału oktanol/woda (P_{ow}) oraz prężność pary badanej substancji chemicznej i powinna być dostępna potwierdzona metoda określania ilościowego substancji chemicznej w roztworach do badań z podaną wydajnością odzysku i granicą wykrywalności.

WAŻNOŚĆ BADANIA

11. Aby badanie było ważne, powinny być spełnione następujące kryteria wykonania:
- Biomasa w kulturach kontrolnych powinna wzrosnąć wykładniczo co najmniej 16-krotnie w ciągu 72-godzinnego okresu badania. Odpowiada to właściwej szybkości wzrostu wynoszącej $0,92 \text{ dnia}^{-1}$. W przypadku najczęściej stosowanych gatunków szybkość wzrostu jest zazwyczaj znacznie większa (zob. dodatek 2). Kryterium to może nie być spełnione, gdy stosuje się gatunki, które wzrastają wolniej niż wymienione w dodatku 2. W takim przypadku okres badania można przedłużyć, aby uzyskać co najmniej 16-krotny wzrost w kulturach kontrolnych, przy czym wzrost musi być wykładniczy w całym okresie badania. Okres badania można skrócić do co najmniej 48 godzin, aby utrzymać nieograniczony wzrost wykładniczy w trakcie badania, pod warunkiem że osiągnięty zostanie co najmniej 16-krotny wzrost.
 - Średni współczynnik zmienności w przypadku właściwej szybkości wzrostu dla poszczególnych odcinków (dni 0–1, 1–2 i 2–3 w przypadku 72-godzinnych badań) w kulturach kontrolnych (zob. dodatek 1 pod hasłem »współczynnik zmienności«) nie może przekraczać 35 %. Obliczanie właściwej szybkości wzrostu dla poszczególnych odcinków przedstawiono w pkt 49. Kryterium to ma zastosowanie do średniej wartości współczynników zmienności obliczonej dla kontrprób kultur kontrolnych.
 - Współczynnik zmienności średniej właściwej szybkości wzrostu w ciągu całego okresu badania w kontrpróbach kultur kontrolnych nie może przekroczyć 7 % w badaniach z udziałem *Pseudokirchneriella subcapitata* i *Desmodesmus subspicatus*. W przypadku innych rzadziej badanych gatunków wartość ta nie powinna przekraczać 10 %.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

12. Sposobem sprawdzenia procedury badania może być zbadanie substancji chemicznych odniesienia, takich jak 3,5-dichlorofenol stosowany w międzynarodowym badaniu międzylaboratoryjnym (1). Jako substancję chemiczną odniesienia dla zielenic można również zastosować dichromian potasowy. Wskazane jest badanie substancji chemicznej odniesienia co najmniej dwa razy w roku.

ZASTOSOWANIE BADANIA

13. Niniejsza metoda badawcza jest najłatwiejsza do stosowania w odniesieniu do substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie, które w warunkach badania prawdopodobnie pozostaną w wodzie. W przypadku badania substancji lotnych, silnie adsorbujących, zabarwionych, mających niską rozpuszczalność w wodzie, lub substancji chemicznych, które mogą wpływać na dostępność składników pokarmowych lub minerałów w pożywce, mogą być wymagane pewne modyfikacje opisywanej procedury (np. układ zamknięty, kondycjonowanie naczyni badawczych). Wskazówki dotyczące pewnych stosownych modyfikacji podano w (2), (3) i (4).

OPIS METODY BADAWCZEJ

Aparatura

14. Naczynie badawcze i inna aparatura, która wchodzi w kontakt z roztworami do badań, powinny być wykonane całkowicie ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Sprzęt należy gruntownie umyć, aby żadne zanieczyszczenia organiczne lub nieorganiczne nie zakłócały wzrostu glonów ani składu roztworów do badań.

15. Naczyniami badawczymi są zwykle kolby szklane o wymiarach umożliwiających uzyskanie dostatecznej objętości kultury do pomiarów podczas badania i na wystarczające przenikanie masy CO₂ z atmosfery (zob. pkt 30). Należy zauważyć, że objętość cieczy musi być wystarczająca dla oznaczeń analitycznych (zob. pkt 37).
16. Ponadto wymagane mogą być niektóre lub wszystkie spośród następujących urządzeń:
 - urządzenia do hodowli kultur: zalecana jest kabina lub komora, w której wybrana temperatura inkubacji może być utrzymywana w granicach ± 2 °C;
 - przyrządy do pomiaru światła: należy zauważyć, że na wartość pomiarową będzie mieć wpływ metoda pomiaru natężenia światła, w szczególności typ receptora (kolektora). Pomiaru należy wykonywać najlepiej przy użyciu receptora sferycznego (4π) (który reaguje na bezpośrednie i odbite światło ze wszystkich kątów powyżej i poniżej płaszczyzny pomiaru) lub receptora 2π (który reaguje na światło ze wszystkich kątów powyżej płaszczyzny pomiaru);
 - aparatura do określania biomasy glonów. Pomiaru liczby komórek, która jest najczęściej stosowanym parametrem zastępczym dla biomasy glonów, można dokonać za pomocą elektronicznego licznika cząstek, mikroskopu z komorą do liczenia oraz cytometru przepływowego. Inne parametry zastępcze biomasy można mierzyć za pomocą cytometru przepływowego, fluorymetru, spektrofotometru lub kolorymetru. Pomocny w obliczeniu jest przelicznik wiążący liczbę komórek z suchą masą. W celu zapewnienia przydatnych pomiarów przy niskich stężeniach biomasy, gdy używa się spektrofotometru, niezbędne może być użycie kuwet o długości ścieżki światła wynoszącej co najmniej 4 cm.

Organizmy użyte do badania

17. Można użyć kilku gatunków niezwiązanych mikroglonów i cyjanobakterii. Wykazano, że w przypadku stosowania procedury badania określonej w niniejszej metodzie badawczej odpowiednie są szczepy wymienione w dodatku 2.
18. Jeżeli wykorzystuje się inne gatunki, należy podać szczep lub pochodzenie. Należy potwierdzić, że przez cały okres badania w panujących warunkach można utrzymać wykładniczy wzrost glonów użytych do badania.

Pożywka

19. Zaleca się dwie alternatywne pożywki – pożywkę OECD i pożywkę AAP. Składy tych pożywek przedstawiono w dodatku 3. Należy zwrócić uwagę, że początkowa wartość pH i pojemność buforowa (regulowanie wzrostu pH) tych dwóch pożywek są różne. Dlatego wyniki badań mogą być różne, w zależności od użytej pożywki, zwłaszcza gdy badane są jonizujące substancje chemiczne.
20. Do niektórych celów, np. gdy bada się metale i czynniki chelatujące lub gdy wykonuje się badanie przy różnych wartościach pH, konieczna może być modyfikacja pożywki wzrostowej. Użycie zmodyfikowanej pożywki należy szczegółowo opisać i uzasadnić (3) (4).

Stężenie początkowej biomasy

21. Początkowa biomasa w badanych kulturach musi być taka sama we wszystkich badanych kulturach i dostatecznie mała, aby umożliwić wzrost wykładniczy w całym okresie inkubacji bez ryzyka wyczerpania składników pokarmowych. Początkowa biomasa nie może przekraczać 0,5 mg/l w przeliczeniu na suchą masę. Zaleca się następujące początkowe stężenia komórek:

Pseudokirchneriella subcapitata $5 \times 10^3 - 10^4$ komórek/ml

Desmodesmus subspicatus $2-5 \times 10^3$ komórek/ml

Navicula pelliculosa 10^4 komórek/ml

Anabaena flos-aquae 10^4 komórek/ml

Synechococcus leopoliensis $5 \times 10^4 - 10^5$ komórek/ml

Stężenia badanej substancji chemicznej

22. Zakres stężenia, w którym mogą wystąpić skutki, można wyznaczyć na podstawie wyników badań ustalających zakres. Do końcowego badania ostatecznego należy wybrać co najmniej pięć stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny, w którym każde kolejne stężenie jest co najwyżej 3,2 raza wyższe od poprzedniego. W przypadku badanych substancji chemicznych wykazujących płaską krzywą zależności stężenie-odpowiedź uzasadnione może być zastosowanie wyższej krotności. Zaleca się, aby szereg stężeń obejmował zakres powodujący zahamowanie tempa wzrostu glonów o 5–75 %.

Kontrpróby i próby kontrolne

23. Projekt badania powinien obejmować trzy kontrpróby przy każdym badanym stężeniu. Jeżeli wyznaczenie NOEC nie jest wymagane, projekt badania można zmienić, zwiększając liczbę stężeń i zmniejszając liczbę kontrprób przypadających na stężenie. Liczba kontrprób kontrolnych musi wynosić co najmniej trzy, a najlepiej powinna być dwukrotnie większa od liczby kontrprób użytych w przypadku każdego badanego stężenia.
24. Do analitycznych oznaczeń stężeń badanej substancji chemicznej można sporządzić oddzielny zestaw roztworów do badań (zob. pkt 36 i 38).
25. Gdy do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej używa się rozpuszczalnika, wówczas w projekcie badania należy przewidzieć dodatkowe próby kontrolne zawierające rozpuszczalnik o takim samym stężeniu jak w badanych kulturach.

Przygotowanie kultury inokulum

26. W celu przystosowania badanych glonów do warunków badania oraz dopilnowania, aby znajdowały się one w fazie wzrostu wykładniczego, gdy są użyte do inokulacji roztworów do badań, kulturę inokulum w pożywce przygotowuje się 2–4 dni przez rozpoczęciem badania. Biomassę glonów należy dostosować, aby umożliwić przeważanie wzrostu wykładniczego w kulturze inokulum do czasu rozpoczęcia badania. Kulturę inokulum inkubuje się w takich samych warunkach jak kultury do badania. Należy zmierzyć przyrost biomasy w kulturze inokulum, aby upewnić się, że wzrost zawiera się w normalnym zakresie dla badanego szczepu w warunkach hodowli. Przykładową procedurę hodowli glonów opisano w dodatku 4. Aby uniknąć synchronicznego podziału komórek podczas badania, wymagany może być drugi etap reprodukcji kultury inokulum.

Sporządzenie roztworów do badań

27. Wszystkie roztwory do badań muszą zawierać takie same stężenia pożywki i taką samą początkową biomasę glonów do badania. Roztwory do badań o wybranych stężeniach sporządza się zwykle przez zmieszanie roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej z pożywką i kulturą inokulum. Roztwory podstawowe sporządza się zwykle, rozpuszczając substancję chemiczną w pożywce.
28. Aby dodać do pożywki substancje chemiczne o małej rozpuszczalności w wodzie jako nośniki można użyć rozpuszczalników, np. acetonu, alkoholu t-butyłowego i dimetyloformamidu (2)(3). Stężenie rozpuszczalnika nie powinno przekraczać 100 µl/l i takie samo stężenie rozpuszczalnika należy dodać do wszystkich kultur (w tym z próbami kontrolnymi) w badanej serii.

Inkubacja

29. Należy przykryć naczynia badawcze korkami przepuszczającymi powietrze. Naczynia wstrząsa się i umieszcza w urządzeniu do hodowli kultur. Podczas badania niezbędne jest utrzymanie glonów w zawiesinie i umożliwienie wnikania CO₂. W tym celu należy stosować ciągłe wstrząsanie lub mieszanie. Kultury należy utrzymywać w temperaturze 21–24 °C, regulowanej z dokładnością do ± 2 °C. Dla gatunków innych niż wymienione w dodatku 2, np. gatunków tropikalnych, odpowiednie mogą być wyższe temperatury, pod warunkiem że spełnione będą kryteria ważności. Zaleca się rozmieścić kolby losowo i codziennie zmieniać ich położenie w inkubatorze.
30. Wartość pH pożywki kontrolnej nie powinna wzrosnąć w trakcie badania o więcej niż 1,5 jednostki. W przypadku metali i substancji chemicznych, które częściowo jonizują się przy pH zbliżonym do pH badania, konieczne może być ograniczenie odchylenia pH w celu otrzymania odtwarzalnych i jednoznacznych wyników. Odchylenie rzędu < 0,5 jednostek pH jest technicznie wykonalne i można je osiągnąć, zapewniając należytą szybkość wnikania masy CO₂ z otaczającego powietrza do roztworu do badań, np. przez zwiększanie szybkości wstrząsania. Inną możliwością jest zmniejszenie zapotrzebowania na CO₂ przez zmniejszenie początkowej biomasy albo skrócenie czasu trwania badania.

31. Powierzchnia, na której następuje inkubacja kultur, powinna mieć zapewnione ciągłe, równomierne oświetlenie fluorescencyjne np. typu »chłodnego światła białego« albo »światła dziennego«. Szczepy glonów i cyjanobakterii różnią się pod względem zapotrzebowania na światło. Natężenie światła należy dobrać w taki sposób, aby odpowiadało ono organizmowi użytemu do badania. Dla zalecanych gatunków zielenic należy wybrać natężenie światła na poziomie roztworów do badań w przedziale $60\text{--}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, zmierzone w czynnym fotosyntetycznym zakresie długości fal $400\text{--}700 \text{ nm}$ przy użyciu odpowiedniego receptora. Niektóre gatunki, w szczególności *Anabaena flos-aquae*, rosną dobrze przy niższych natężeniach światła, a przy wyższych mogą ulec uszkodzeniu. Dla takich gatunków należy wybrać średnie natężenie światła w zakresie $40\text{--}60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. (W przypadku przyrządów do pomiaru światła kalibrowanych w luksach zalecanemu natężeniu światła $60\text{--}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ odpowiada w przybliżeniu równoważny zakres $4\,440\text{--}8\,880$ luksów dla chłodnego światła białego). Natężenie światła należy utrzymywać w zakresie $\pm 15\%$ od średniego natężenia światła na powierzchni inkubacji.

Czas trwania badania

32. Badanie zwykle trwa 72 godzin. Można jednak zastosować krótsze albo dłuższe okresy trwania badania, pod warunkiem że spełnione mogą zostać kryteria ważności podane w pkt 11.

Pomiary i oznaczenia analityczne

33. Biomasy glonów w każdej kolbie ustala się co najmniej raz dziennie w okresie badania. Jeżeli pomiary dokonywane są na małych objętościach pobranych z roztworu do badań za pomocą pipety, wówczas objętości takich nie należy uzupełniać.
34. Pomiar biomasy wykonuje się poprzez ręczne zliczanie komórek za pomocą mikroskopu lub elektronicznego licznika cząstek (określając liczbę komórek lub objętość). Można zastosować alternatywne techniki, np. cytometrię przepływową, fluorescencję chlorofilu *in vitro* albo *in vivo* (5) (6) lub gęstość optyczną, pod warunkiem że można wykazać zadowalającą korelację z biomasą w całym zakresie biomasy występującym w badaniu.
35. Należy zmierzyć pH roztworów na początku i na końcu badania.
36. Jeśli dostępna jest procedura analityczna dla oznaczania badanej substancji chemicznej w zastosowanym zakresie stężeń, roztwory do badań należy poddać analizie celem sprawdzenia początkowych stężeń i utrzymania stężeń ekspozycyjnych w trakcie badania.
37. Analiza stężenia badanej substancji chemicznej na początku i końcu badania niskiego i wysokiego badanego stężenia oraz stężenia zbliżonego do oczekiwanego EC_{50} może być wystarczająca, jeśli prawdopodobne jest, że stężenia ekspozycyjne będą odbiegać od wartości nominalnych w trakcie badania o mniej niż 20 %. Gdy natomiast jest mało prawdopodobne, że stężenia pozostaną w granicach 80–120 % stężenia nominalnego, zaleca się analizę wszystkich badanych stężeń na początku i końcu badania. W przypadku badania substancji chemicznych lotnych, nietrwałych lub silnie adsorbujących zaleca się dodatkowe pobieranie próbek do analizy w odstępach 24-godzinnych w ciągu okresu narażenia, aby dokładniej ustalić stratę badanej substancji chemicznej. W przypadku tych substancji chemicznych konieczne mogą okazać się dodatkowe kontrpróby. We wszystkich przypadkach oznaczenie stężeń badanej substancji chemicznej musi być wykonywane tylko na jednym naczyniu z kontrpróbą przy każdym badanym stężeniu (lub na połączonych zawartościach naczyń z kontrpróbą).
38. Pożywki sporządzone specjalnie do analizy stężeń ekspozycyjnych podczas badania należy potraktować dokładnie tak samo jak pożywki użyte do badania, tzn. należy je zaszczyć glonami i inkubować w identycznych warunkach. Jeżeli wymagana jest analiza stężenia rozpuszczonej badanej substancji chemicznej, konieczne może być oddzielenie glonów od pożywki. Oddzielenia należy dokonać najlepiej przez odwirowanie przy małej sile grawitacji, wystarczającej do osadzenia się glonów.
39. Jeżeli istnieją dowody, że stężenie badanej substancji chemicznej zostało zadowalająco utrzymane w granicach $\pm 20\%$ nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia w ciągu całego badania, to analizę wyników można oprzeć na nominalnych lub zmierzonych początkowych wartościach. Jeśli odchylenie od nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia nie mieści się w zakresie $\pm 20\%$, to analizę wyników należy oprzeć na średnim geometrycznym stężeniu w ciągu narażenia lub na modelach opisujących spadek stężenia badanej substancji chemicznej (3) (7).
40. Badanie zahamowania wzrostu glonów odbywa się w bardziej dynamicznym układzie badawczym niż większość innych krótkookresowych badań toksyczności dla organizmów wodnych. W rezultacie faktyczne stężenia ekspozycyjne mogą być trudne do określenia, zwłaszcza dla adsorbujących substancji chemicznych badanych w niskich stężeniach. W takich przypadkach zniknięcie badanej substancji chemicznej z roztworu

przez adsorpcję do rosnącej masy glonów nie oznacza jej utraty z układu badawczego. Podczas analizy wyniku badania należy sprawdzić, czy zmniejszeniu stężenia badanej substancji chemicznej w trakcie badania towarzyszy spadek zahamowania wzrostu. Jeżeli tak się dzieje, można rozważyć zastosowanie odpowiedniego modelu opisującego spadek stężenia badanej substancji chemicznej (7). W przeciwnym razie wskazane może być przeprowadzenie analizy w oparciu o wyniki uzyskane przy początkowych (nominalnych lub zmierzonych) stężeniach.

Pozostałe obserwacje

41. Należy przeprowadzić obserwacje mikroskopowe w celu sprawdzenia, czy wygląd kultury inokulum jest normalny i zdrowy oraz zaobserwowania ewentualnego nietypowego wyglądu glonów (który może być spowodowany narażeniem na badaną substancję chemiczną) na końcu badania.

Badanie graniczne

42. W niektórych okolicznościach, na przykład gdy badanie wstępne wskazuje, że badana substancja chemiczna nie ma skutków toksycznych w stężeniach do 100 mg/l lub do jej rozpuszczalności granicznej w pożywce (w zależności od tego, która wartość jest niższa), można przeprowadzić badanie graniczne polegające na porównaniu reakcji w grupie kontrolnej i jednej grupie badanej (o stężeniu 100 mg/l lub równym granicznej rozpuszczalności). Zdecydowanie zaleca się, aby takie badanie było poparte analizą stężenia ekspozycyjnego. Do badania granicznego stosują się wszystkie poprzednio opisane warunki badania i kryteria ważności, z tym że liczba kontrolnych poddawanych zabiegowi powinna wynosić co najmniej sześć. Zmienne zależne w grupie badanej i w grupie kontrolnej można analizować przy użyciu testu statystycznego do porównywania średnich, np. testu t-Studenta. Jeżeli wariancje obydwu grup są nierówne, należy wykonać test t-Studenta dostosowany dla nierównych wariancji.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Wykreślenie krzywych wzrostu

43. Biomasa w naczyniach badawczych może być wyrażona w jednostkach parametru zastępczego użytego do pomiaru (np. liczby komórek, fluorescencji).
44. Należy zestawić w postaci tabelarycznej oszacowane stężenie biomasy w badanych kulturach i w kontrolnych wraz ze stężeniami badanego materiału i czasami pomiaru zarejestrowanymi z dokładnością co najmniej do pełnych godzin, aby sporządzić wykresy krzywych wzrostu. Na tym pierwszym etapie mogą być przydatne zarówno skale logarytmiczne, jak i liniowe, lecz skale logarytmiczne są obowiązkowe i na ogół dają lepszy obraz zmienności przebiegu wzrostu w okresie badania. Należy zwrócić uwagę, że wzrost wykładniczy w wyniku wykreślenia na skali logarytmicznej tworzy prostą linię, a nachylenie linii (kierunek i kąt nachylenia) oznacza właściwą szybkość wzrostu.
45. Za pomocą wykresów należy zbadać, czy kultury kontrolne wzrastają wykładniczo w spodziewanym tempie w trakcie całego badania. Należy krytycznie zbadać wszystkie punkty danych oraz wygląd wykresów i sprawdzić dane surowe i procedury pod kątem możliwych błędów. Należy sprawdzić w szczególności wszelkie punkty danych, które wydają się stanowić odchylenia spowodowane błędem systematycznym. Jeżeli jest oczywiste, że można stwierdzić lub uznać za wysoce prawdopodobne błędy proceduralne, to określony punkt danych oznacza się jako wartość oddaloną i nie ujmuje się go w późniejszej analizie statystycznej. (Zerowe stężenie glonów w jednym z dwóch lub trzech naczyń z kontrolną może oznaczać, że naczynie to nie zostało poprawnie zaszczipione lub że zostało niewłaściwie wyczyszczone). Powody odrzucenia punktu danych jako wartości oddalonej należy wyraźnie podać w sprawozdaniu z badania. Akceptowanymi powodami są wyłącznie (rzadkie) błędy proceduralne, a nie tylko niedostateczna dokładność. Procedury statystyczne dotyczące identyfikacji wartości oddalonych mają ograniczone zastosowanie do zagadnienia tego typu i nie mogą zastąpić wiedzy fachowej. Wskazane jest, aby wartości oddalone (zaznaczone jako takie) zachować wśród punktów danych przedstawionych w późniejszej graficznej lub tabelarycznej prezentacji danych.

Zmienne zależne

46. Celem badania jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na wzrost glonów. W niniejszej metodzie badawczej opisuje się dwie zmienne zależne, gdyż różne jurysdykcje mają różne preferencje i potrzeby regulacyjne. Aby wyniki badania były akceptowalne we wszystkich jurysdykcjach, wpływ należy ocenić przy użyciu obydwu zmiennych zależnych a) i b) opisanych poniżej.
 - a) średnia właściwa szybkość wzrostu: tę zmienną zależną oblicza się na podstawie logarytmicznego dziennego przyrostu biomasy w okresie badania;
 - b) przyrost: tą zmienną zależną jest biomasa na końcu badania po odjęciu początkowej biomasy.

47. Należy zauważyć, że wartości toksyczności obliczone przy użyciu tych dwóch zmiennych zależnych nie są porównywalne i różnicę tę należy uwzględnić przy wykorzystywaniu wyników badania. Jeżeli spełnione są warunki badania określone w niniejszej metodzie badawczej, wartości EC_x oparte na średniej właściwej szybkości wzrostu ($E_r C_x$) będą zwykle wyższe od wyników opartych na przyroście ($E_y C_x$) ze względu na podstawę matematyczną tych podejść. Nie należy interpretować tego jako różnicy wrażliwości pomiędzy tymi dwiema zmiennymi zależnymi, lecz jedynie jako stwierdzenie, że wartości te są różne pod względem matematycznym. Pojęcie średniej właściwej szybkości wzrostu opiera się na ogólnym przebiegu wzrostu wykładniczego glonów w nieograniczonych kulturach, gdzie toksyczność szacuje się na podstawie wpływu na szybkość wzrostu, przy czym nie jest ona zależna od bezwzględnego poziomu właściwej szybkości wzrostu próby kontrolnej, nachylenia krzywej zależności stężenie-odpowiedź ani czasu trwania badania. Natomiast wyniki oparte na zmiennej zależnej w postaci przyrostu są zależne od wszystkich tych pozostałych zmiennych. $E_y C_x$ jest zależne od właściwej szybkości wzrostu gatunków glonów użytych w każdym badaniu oraz od maksymalnej właściwej szybkości wzrostu, która może być różna dla różnych gatunków, a nawet dla różnych szczepów glonów. Tej zmiennej zależnej nie powinno się używać do porównywania wrażliwości na substancje toksyczne pomiędzy gatunkami glonów lub nawet różnymi ich szczepami. Choć z naukowego punktu widzenia preferuje się szacowanie toksyczności z wykorzystaniem średniej właściwej szybkości wzrostu, oszacowania toksyczności na podstawie przyrostu są również objęte niniejszą metodą badawczą, co pozwala spełnić obecne wymogi regulacyjne istniejące w niektórych krajach.

Średnia szybkość wzrostu

48. Średnią właściwą szybkość wzrostu dla konkretnego okresu oblicza się jako logarytmiczny przyrost biomasy z równania dla każdego naczynia z grupami kontrolnymi i próbami poddawanych badaniu [1]:

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

gdzie:

μ_{i-j} to średnia właściwa intensywność wzrostu od momentu i do j ;

X_i to biomasa w czasie i ;

X_j to biomasa w czasie j .

Dla każdej grupy badanej i kontrolnej należy obliczyć średnią wartość szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji.

49. Obliczyć średnią właściwą szybkość wzrostu w całym okresie badania (zwykle dni 0–3), wykorzystując nominalnie zaszczipioną biomasę jako wartość początkową zamiast zmierzonej wartości początkowej, ponieważ w ten sposób zwykle uzyskuje się większą dokładność. Jeżeli urządzenie używane do pomiaru biomasy pozwala na dostatecznie dokładne określenie małej biomasy inokulum (np. cytometr przepływowy), wówczas można użyć zmierzonego początkowego stężenia biomasy. Należy również ocenić szybkość wzrostu dla poszczególnych odcinków, obliczoną jako właściwą szybkość wzrostu dla każdego dnia w trakcie badania (dni 0–1, 1–2 i 2–3), oraz zbadać, czy szybkość wzrostu w grupie kontrolnej pozostaje stała (zob. kryteria ważności, pkt 11). Właściwa szybkość wzrostu znacząco niższa w pierwszym dniu od ogólnej średniej właściwej szybkości wzrostu może oznaczać fazę zwłoki. Podczas gdy fazę zwłoki można zminimalizować i praktycznie wyeliminować w kulturach kontrolnych przez odpowiednie rozmnożenie kultury pierwotnej, faza zwłoki w kulturach narażonych może oznaczać regenerację po początkowym wstrząsie toksycznym lub zmniejszonym narażeniu wskutek straty badanej substancji chemicznej (w tym jej sorpcji na biomase glonów) po początkowym narażeniu. Stąd można określić szybkość wzrostu dla poszczególnych odcinków, aby ocenić skutki badanej substancji chemicznej występujące w ciągu okresu narażenia. Znaczące różnice pomiędzy szybkością wzrostu dla poszczególnych odcinków a średnią szybkością wzrostu świadczą o odchyleniu od stałego wzrostu wykładniczego i uzasadniają dokładne zbadanie krzywych wzrostu.
50. Należy obliczyć procentowe zahamowanie tempa wzrostu dla każdej kontrpróby poddawanej badaniu za pomocą równania [2]:

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

gdzie:

$\% I_r$ = procentowe zahamowanie średniej właściwej szybkości wzrostu;

μ_c = średnia wartość średniej właściwej szybkości wzrostu (μ) w grupie kontrolnej;

μ_T = średnia właściwa szybkość wzrostu dla kontrpróby poddawanej badaniu.

51. Jeżeli do sporządzenia roztworów do badań użyto rozpuszczalników, przy obliczaniu procentowego zahamowania należy użyć prób kontrolnych z rozpuszczalnikiem zamiast prób kontrolnych bez rozpuszczalnika.

Przyrost

52. Przyrost oblicza się jako biomasę na końcu badania po odjęciu biomasy na początku badania dla każdego naczynia z próbami kontrolnymi i badanymi. Dla każdego badanego stężenia i próby kontrolnej należy obliczyć średnią wartość przyrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Dla każdej kontrpróby poddawanej badaniu można obliczyć procentowe zahamowanie przyrostu ($\% I_y$) w następujący sposób:

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

gdzie:

$\% I_y$ = procentowe zahamowanie przyrostu;

Y_c = średnia wartość przyrostu w grupie kontrolnej;

Y_T = wartość przyrostu dla badanej kontrpróby.

Wykreślenie krzywej zależności stężenie-odpowiedź

53. Należy wykreślić procentową wartość zahamowania w funkcji logarytmu stężenia badanej substancji chemicznej i dokładnie zbadać wykres, pomijając każdy punkt danych, który został potraktowany jako wartość oddalona w pierwszej fazie. Należy dopasować ciągłą linię pomiędzy punktami danych »na oko« lub za pomocą komputerowej interpolacji, aby uzyskać pierwsze wrażenie dotyczące zależności stężenie-odpowiedź, a następnie kontynuować z zastosowaniem bardziej szczegółowej metody, najlepiej komputerowej metody statystycznej. W zależności od zamierzonego wykorzystania danych, jakości (dokładności) i ilości danych, jak również dostępności narzędzi do analizy danych, można podjąć decyzję (co niekiedy będzie uzasadnione) o przerwaniu analizy danych na tym etapie i można po prostu odczytać główne wartości EC_{50} i EC_{10} (lub EC_{20}) z dopasowanej »na oko« krzywej (zob. również sekcja dotycząca skutków stymulujących poniżej). Niezastosowanie metody statystycznej może wynikać z następujących uzasadnionych powodów:

- dane nie są odpowiednie do tego, aby metody komputerowe przyniosły wyniki bardziej wiarygodne od uzyskanych na podstawie wiedzy fachowej – w takich sytuacjach niektóre programy komputerowe mogą nawet nie dostarczyć wiarygodnego rozwiązania (iteracje mogą nie osiągnąć zbieżności itp.);
- efektu stymulacji wzrostu nie można w zadowalający sposób przetworzyć za pomocą dostępnych programów komputerowych (zob. poniżej).

Procedury statystyczne

54. Celem jest uzyskanie ilościowej zależności stężenie-odpowiedź za pomocą analizy regresji. Możliwe jest zastosowanie ważonej regresji liniowej po przeprowadzeniu transformacji linearyzującej danych odpowiedzi – na przykład do jednostek probit, logit albo Weibulla (8), lecz preferowane są procedury regresji nieliniowej, które lepiej sprawdzają się w przypadku nieuniknionych nieregularności danych i odchyłeń od gładkich rozkładów. Przy zbliżaniu się do zerowego albo całkowitego zahamowania nieregularności takie mogą zostać powiększone przez transformację, zakłócając analizę (8). Należy zwrócić uwagę, że standardowe metody analizy przy użyciu transformat probit, logit albo Weibulla są przeznaczone do stosowania do danych binarnych (np. dotyczących śmiertelności lub przeżywalności) i muszą zostać zmodyfikowane, aby uwzględnić dane dotyczące wzrostu lub biomasy. Szczegółowe procedury wyznaczania wartości EC_x na podstawie danych ciągłych można znaleźć w (9), (10) i (11). Zastosowanie analizy regresji nieliniowej jest opisane szczegółowo w dodatku 5.

55. Dla każdej zmiennej zależnej, która ma być analizowana, należy zastosować zależność stężenie-odpowiedź do obliczenia oszacowań punktowych wartości EC_x . W miarę możliwości dla każdego oszacowania należy określić granice ufności na poziomie 95 %. Zgodność danych odpowiedzi z modelem regresji należy ocenić graficznie lub statystycznie. Analizę regresji należy przeprowadzić z zastosowaniem odpowiedzi z poszczególnych kontrprób, a nie średnich z grup badanych. Jeśli jednak dopasowanie krzywej nieliniowej jest trudne lub nie udaje się z powodu zbyt dużego rozrzutu danych, problem ten można ominąć, wykonując regresję na średnich z grup, co jest praktycznym sposobem na ograniczenie wpływu podejrzewanych wartości oddalonych. Wybór tej opcji należy zaznaczyć w sprawozdaniu z badania jako odstępstwo od normalnej procedury wynikłe stąd, że dopasowania krzywej za pomocą indywidualnych kontrprób nie przyniosły zadowalającego rezultatu.
56. Oszacowania wartości EC_{50} i granice ufności można również otrzymać przy użyciu interpolacji liniowej z zastosowaniem metody bootstrap (13), jeżeli dostępne modele/metody regresji są nieodpowiednie do danych.
57. W celu oszacowania LOEC, a następnie NOEC, w odniesieniu do wpływu badanej substancji chemicznej na intensywność wzrostu, konieczne jest porównanie średnich z grup badanych przy użyciu technik analizy wariancji (ANOVA). Średnią dla każdego stężenia należy następnie porównać ze średnią kontrolną przy użyciu odpowiedniej metody wielokrotnego porównania lub testu trendu. Przydatny może być test Dunnetta lub test Williamsa (12)(14)(15)(16)(17). Należy ocenić, czy przyjęte w ANOVA założenie jednorodności wariancji nadal obowiązuje. Ocenę tę można przeprowadzić graficznie albo za pomocą formalnego testu (17). Odpowiednimi do tego celu testami są testy Levene'a lub Bartletta. Niespełnienie założenia o jednorodności wariancji można niekiedy skorygować za pomocą transformacji logarytmicznej danych. Jeżeli niejednorodność wariancji jest ekstremalna i nie można jej skorygować przez transformację, należy rozważyć analizę za pomocą takich metod jak regresyjne testy Jonckheere'a. Dodatkowe wskazówki dotyczące wyznaczania NOEC można znaleźć w (11).
58. W wyniku najnowszych osiągnięć naukowych zaleca się odstąpienie od stosowania pojęcia NOEC i zastąpienie go opartymi o regresję oszacowaniami punktowymi wartości EC_x . Dla opisywanego badania glonów nie ustalono odpowiedniej wartości x . Wydaje się, że odpowiedni jest przedział 10–20 % (w zależności od wybranej zmiennej zależnej), a najlepiej należy podać zarówno EC_{10} , jak i EC_{20} .

Stymulacja wzrostu

59. Przy niskich stężeniach obserwuje się niekiedy stymulację wzrostu (zahamowanie ujemne). Może to wynikać z hormezy («toksycznej stymulacji») albo z dodania stymulujących czynników wzrostu z materiałem badanym do użytej minimalnej pożywki. Należy zwrócić uwagę, że dodanie nieorganicznych składników odżywczych nie powinno mieć bezpośrednich skutków, ponieważ pożywka powinna zachować nadmiar składników odżywczych w ciągu całego badania. Stymulację niskodawkową można zwykle pominąć w obliczeniach EC_{50} , chyba że jest skrajna. Jeżeli jednak jest ona skrajna albo jeżeli ma być obliczona wartość EC_x dla małego x , wówczas mogą być wymagane specjalne procedury. Należy w miarę możliwości unikać usuwania reakcji stymulujących z analizy danych i jeżeli dostępne oprogramowanie do dopasowywania krzywych nie może zaakceptować drobnej stymulacji, wówczas można posłużyć się interpolacją liniową z metodą bootstrap. Jeżeli stymulacja jest skrajna, można rozważyć zastosowanie modelu hormezy (18).

Nietoksyczne zahamowanie wzrostu

60. Materiały badane pochłaniające światło mogą przyczyniać się do ograniczenia tempa wzrostu, ponieważ zacienienie zmniejsza ilość dostępnego światła. Takie fizyczne typy skutków należy oddzielić od skutków toksycznych przez zmodyfikowanie warunków badania, a te pierwsze skutki podać osobno w sprawozdaniu. Wskazówki można znaleźć w (2) i (3).

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

61. Sprawozdanie z badania musi zawierać poniższe informacje.

Badana substancja chemiczna:

- właściwości fizyczne i, w stosownych przypadkach, właściwości fizykochemiczne, w tym graniczna rozpuszczalność w wodzie;
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej (np. numer CAS), w tym czystość (zanieczyszczenia).

Badany gatunek:

- szczep, dostawca lub źródło oraz zastosowane warunki kultury.

Warunki badania:

- data rozpoczęcia badania i czas jego trwania;
- opis projektu badania: naczynia badawcze, objętości kultur, zagęszczenie biomasy na początku badania;
- skład pożywki;
- badane stężenia i kontrpróby (np. liczba kontrprób, liczba badanych stężeń oraz zastosowany ciąg geometryczny);
- opis sporządzania roztworów do badań, w tym użycia rozpuszczalników itp.
- urządzenie do hodowli kultur;
- natężenie i jakość światła (źródło, jednorodność);
- temperatura;
- badane stężenia: badane stężenia nominalne oraz wszelkie wyniki analiz ustalających stężenia badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych. Należy odnotować sprawność metody oraz granicę oznaczalności w zestawie badań;
- wszelkie odstępstwa od niniejszej metody badawczej;
- metoda określania biomasy oraz dowody korelacji pomiędzy mierzonym parametrem a suchą masą.

Wyniki:

- wartości pH na początku i na końcu badania w przypadku wszystkich zabiegów;
- biomasa dla każdej kolby w każdym punkcie pomiarowym oraz metoda pomiaru biomasy;
- krzywe wzrostu (wykres zależności biomasy od czasu);
- obliczone zmienne zależne dla każdej kontrpróby poddanej zabiegowi wraz z wartościami średnimi i współczynnikiem zmienności dla kontrprób;
- graficzne przedstawienie zależności stężenie/skutek;
- oszacowania toksyczności dla zmiennych zależnych, np. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} oraz związane z nimi przedziały ufności. LOEC i NOEC, jeżeli zostały obliczone, oraz metody statystyczne użyte do ich wyznaczenia;
- jeżeli zastosowano ANOVA – wielkość wpływu, który można wykryć (np. najmniejsza znacząca różnica);
- wszelka stymulacja wzrostu stwierdzona w którymkolwiek zabiegu;
- wszelkie inne zaobserwowane skutki, np. morfologiczne zmiany glonów;
- omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1993). ISO 8692: Water quality – Algal growth inhibition test.
- (2) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1998). ISO/DIS 14442. Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa. Seria dotycząca badań i oceny, nr 23. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.
- (4) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

-
- (5) Mayer, P., Cuhel, R. i Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2 525–2 531.
 - (6) Slovencey, R.E. i Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22: 919–925
 - (7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. i 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. i Christensen E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157–167.
 - (10) Bruce, R.D. i 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. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.
 - (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. i Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, wydanie 2. Wiley, Nowy Jork.
 - (18) Brain, P. i Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93–96.
-

Dodatek 1

Definicje

Do celów niniejszej metody badawczej użyto następujących definicji i skrótów.

Biomasa jest to sucha masa materii żywej obecnej w populacji, przypadająca na objętość, np. mg glonów/litr roztworu do badań. Zwykle »biomasę« określa się w postaci masy, lecz w niniejszym badaniu słowo to użyte jest w odniesieniu do masy przypadającej na objętość. Ponadto w niniejszym badaniu zwykle mierzy się również surogaty biomasy, takie jak liczba komórek, fluorescencja itp., w związku z czym określenie »biomasa« odnosi się także do tych pomiarów zastępczych.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Współczynnik zmienności jest bezwymiarową miarą zmienności parametru, określoną jako stosunek odchylenia standardowego do średniej. Może on być również wyrażony jako wartość procentowa. Średni współczynnik zmienności właściwej szybkości wzrostu w kulturach kontrolnych kontrprób należy obliczyć w następujący sposób:

1. obliczyć procentowy współczynnik zmienności średniej właściwej szybkości wzrostu z szybkości wzrostu dla poszczególnych dni/odcinków dla odnośnej kontrpróby;
2. obliczyć wartość średnią ze wszystkich wartości obliczonych w punkcie 1, aby otrzymać średni współczynnik zmienności właściwej szybkości wzrostu dla poszczególnych dni/odcinków w kontrpróbach kultur kontrolnych.

EC_x jest stężeniem badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w pożywce, powodującym zmniejszenie wzrostu organizmu użytego do badania o x % (np. 50 %) w danym okresie narażenia (który należy wyraźnie określić, jeśli odbiega od pełnego lub normalnego czasu trwania badania). Aby jednoznacznie oznaczyć wartość stężenia efektywnego (EC) wynikającą z szybkości wzrostu albo przyrostu, w odniesieniu do szybkości wzrostu używa się symbolu »E_C«, a w odniesieniu do przyrostu – symbolu »E_pC«.

Pożywka jest to kompletne syntetyczne podłoże, na którym glony wzrastają, gdy są narażone na działanie badanej substancji chemicznej. Badana substancja chemiczna jest zwykle rozpuszczona w pożywce.

Szybkość wzrostu (średnia właściwa szybkość wzrostu) jest to logarytmiczny przyrost biomasy w okresie narażenia.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC) jest to najniższe badane stężenie, przy którym obserwuje się, że substancja chemiczna ma statystycznie istotny wpływ na ograniczenie wzrostu (przy $p < 0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną w danym czasie narażenia. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC muszą mieć szkodliwy skutek równy lub większy niż te, które są obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy te dwa warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC).

Stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) jest to badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC.

Zmienna zależna jest to zmienna służąca do szacowania toksyczności, uzyskana z dowolnych zmierzonych parametrów opisujących biomasę za pomocą różnych metod obliczania. W przypadku niniejszej metody badawczej zmiennymi zależnymi są szybkość wzrostu i przyrost, które otrzymuje się bezpośrednio z pomiaru biomasy albo z pomiaru dowolnego ze wspomnianych surogatów.

Właściwa szybkość wzrostu jest to zmienna zależna określona jako iloraz różnicy logarytmów naturalnych parametru obserwacji (w niniejszej metodzie badawczej – biomasy) i odnośnego okresu.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Przyrost jest to wartość zmiennej pomiarowej na końcu okresu narażenia minus wartość zmiennej pomiarowej na początku okresu narażenia, wyrażająca przyrost biomasy w trakcie badania.

Dodatek 2

Szczepy nadające się do wykorzystania w badaniu**Zielenice**

Pseudokirchneriella subcapitata (znana wcześniej jako *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (znana wcześniej jako *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Okrzemki

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cyjanobakterie

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

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Źródła szczepów

Zalecane szczepy dostępne są w kulturach pojedynczych glonów z następujących zbiorów (w kolejności alfabetycznej):

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

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Ambleside
Cumbria LA22 0LP
ZJEDNOCZONE KRÓLESTWO

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
NIEMCY

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
STANY ZJEDNOCZONE.

Wygląd i cechy charakterystyczne zalecanych gatunków

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Wygląd	Zakrzywione, skręcone pojedyncze komórki	Owalne, głównie pojedyncze komórki	Pałeczki	Łańcuchy owalnych komórek	Pałeczki
Rozmiar (dł. × szer.) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Objętość komórek (µm ³ /komórka)	40–601 ⁽¹⁾	60–801 ⁽¹⁾	40–501 ⁽¹⁾	30–401 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Sucha masa komórek (mg/komórka)	2–3 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	1–2 × 10 ⁻⁸	2–3 × 10 ⁻⁹
Szybkość wzrostu ⁽³⁾ (dzień ⁻¹)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

⁽¹⁾ Zmierzone za pomocą elektronicznego licznika cząstek.

⁽²⁾ Obliczone na podstawie rozmiaru.

⁽³⁾ Najczęściej obserwowana szybkość wzrostu w pożywce OECD przy natężeniu światła wynoszącym około 70 µE m⁻² s⁻¹ i 21 °C.

Specjalne zalecenia dotyczące hodowli i prowadzenia kultur gatunków zalecanych do użycia w badaniach***Pseudokirchneriella subcapitata* i *Desmodesmus subspicatus***

Zielenice te są zasadniczo łatwe do utrzymania na różnych pożywkach hodowlanych. Informacje dotyczące odpowiednich pożywek są dostępne w placówkach posiadających zbiory kultur. Komórki występują zazwyczaj pojedynczo, a pomiary zagęszczenia komórek można z łatwością wykonać za pomocą elektronicznego licznika cząstek lub mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

W celu utrzymania kultury wyjściowej stosować można różne pożywki. Szczególnie istotne jest, aby w hodowlach okresowych nie dopuścić do przekroczenia fazy logarytmicznego wzrostu podczas odnawiania, ponieważ odzysk w tym momencie jest utrudniony.

Anabaena flos-aquae tworzy agregaty upakowanych łańcuchów komórek. Wielkość tych agregatów różni się w zależności od warunków hodowli. W przypadku liczenia komórek pod mikroskopem może zachodzić konieczność rozbicia tych skupisk; ewentualnie do obliczenia biomasy używa się elektronicznego licznika cząstek.

Aby ograniczyć zmienność wyników obliczeń, można rozbijać podpróbki metodą sonikacji. Sonikacja trwająca dłużej niż wymaga tego rozbicie łańcuchów na krótsze odcinki może spowodować zniszczenie komórek. W przypadku każdego zabiegu natężenie i czas trwania sonikacji muszą być identyczne.

Aby łatwiej było skompensować zmienność wyników liczenia, należy policzyć na hemocytometrze dostateczną liczbę pól (co najmniej 400 komórek). Pozwoli to zwiększyć wiarygodność mikroskopowych oznaczeń gęstości.

Po uprzednim rozbiciu łańcuchów komórek metodą sonifikacji z zachowaniem ostrożności, do wyznaczenia całkowitej objętości komórek *Anabaena* można użyć elektronicznego licznika cząstek. Energia procesu sonifikacji musi zostać wyregulowana, aby nie doprowadzić do rozerwania komórek.

Użyć wstrząsarki lub podobnej odpowiedniej metody w celu zapewnienia dobrego wymieszania i jednorodności zawiesiny glonów użytej do zaszczepiania naczyni badawczych.

Naczynia badawcze należy umieścić na blacie wstrząsarki o ruchu obrotowym lub posuwisto-zwrotnym, nastawionej na około 150 obrotów na minutę. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie wstrząsania przerywanego, aby zmniejszyć tendencję bakterii *Anabaena* do zbijania się w skupiska. W przypadku tworzenia się skupisk należy dołożyć starań, aby uzyskać próbki reprezentatywne dla pomiarów biomasy. Przed pobraniem próbek może zająć potrzeba energicznego wstrząsania w celu rozbicia skupisk glonów.

Synechococcus leopoliensis

W celu utrzymania hodowli kultury wyjściowej stosować można różne pożywki. Informacje dotyczące odpowiednich pożywek są dostępne w placówkach posiadających zbiory kultur.

Synechococcus leopoliensis rozwija się w postaci odosobnionych komórek mających kształt laseczek. Komórki są bardzo małe, przez co liczenie mikroskopowe na potrzeby pomiarów biomasy jest skomplikowane. Przydatne są elektroniczne liczniki cząstek przystosowane do liczenia cząstek o minimalnych rozmiarach wynoszących około 1 µm. Można zastosować również pomiary fluorometryczne in vitro.

Navicula pelliculosa

W celu utrzymania hodowli kultury wyjściowej stosować można różne pożywki. Informacje dotyczące odpowiednich pożywek są dostępne w placówkach posiadających zbiory kultur. Należy zwrócić uwagę, że pożywka musi zawierać krzemian.

W pewnych warunkach wzrostu *Navicula pelliculosa* może tworzyć skupiska. Z uwagi na wytwarzanie lipidów komórki glonów wykazują niekiedy tendencję do gromadzenia się w warstwie powierzchniowej. Aby w takich okolicznościach uzyskać próbki reprezentatywne, należy zastosować szczególne środki podczas pobierania podpróbek do określania biomasy. Konieczne może być energiczne mieszanie, np. z użyciem wstrząsarki.

Dodatek 3

Pożywki

Można stosować jedną z dwóch wymienionych poniżej pożywek:

- pożywkę OECD: pierwotna pożywka według dotyczącej badań wytycznej OECD nr 201, zgodna również z normą ISO 8692;
- pożywka AAP (US EPA), zgodna również z ASTM.

Do przygotowania tych pożywek należy użyć odczynników lub substancji chemicznych do analiz oraz wody dejonizowanej.

Skład pożywki AAP (US EPA) i pożywki OECD TG 201

Składnik	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
NaHCO ₃	15,0	0,179	50,0	0,595
NaNO ₃	25,5	0,300		
NH ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ · 6(H ₂ O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ · 2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ · 7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ · 6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA · 2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ · 4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ · 6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ · 2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ · 2(H ₂ O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Stosunek molowy EDTA do żelaza nieznacznie przekracza jeden. Zapobiega to strącaniu się żelaza, a jednocześnie zminimalizowane jest chelatowanie jonów metali ciężkich.

W badaniu z użyciem okrzemka *Navicula pelliculosa* obydwie pożywki należy uzupełnić $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, aby uzyskać stężenie 1,4 mg Si/l.

Wartość pH pożywki uzyskuje się przy zachowaniu równowagi pomiędzy układem węglanowym pożywki a ciśnieniem cząstkowym CO_2 w powietrzu atmosferycznym. Przybliżona zależność pomiędzy pH w temp. 25 °C a stężeniem molowym dwuwęglanu jest następująca:

$$\text{pH}_{\text{eq}} = 11.30 + \log[\text{HCO}_3]$$

Przy 15 mg NaHCO_3/l , $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (pożywka U.S. EPA), a przy 50 mg NaHCO_3/l , $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (pożywka OECD).

Skład pierwiastkowy pożywek przeznaczonych do badań

Pierwiastek	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

Przygotowanie pożywki OECD

Składnik odżywczy	Stężenie w roztworze podstawowym
Roztwór podstawowy 1: makroskładniki odżywcze	
NH_4Cl	1,5 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Roztwór podstawowy 2: żelazo	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l

Składnik odżywczy	Stężenie w roztworze podstawowym
Roztwór podstawowy 3: pierwiastki śladowe	
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
Roztwór podstawowy 4: wodorowęglan	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	

Roztwory podstawowe poddać sterylizacji na filtrze membranowym (średnia średnica porów 0,2 μm) lub w autoklawie (120 °C, 15 minut). Roztwory przechowywać bez dostępu światła w temperaturze 4 °C.

Roztworów podstawowych 2 i 4 nie poddawać sterylizacji w autoklawie, tylko na filtrze membranowym.

Przygotować pożywkę, dodając do wody roztwory podstawowe 1–4 w odpowiedniej objętości:

do 500 ml wysterylizowanej wody dodać:

10 ml roztworu podstawowego 1;

1 ml roztworu podstawowego 2;

1 ml roztworu podstawowego 3;

1 ml roztworu podstawowego 4;

Uzupełnić wysterylizowaną wodą do 1 000 ml.

Zapewnić wystarczająco dużo czasu na osiągnięcie równowagi między pożywką i CO_2 , w razie potrzeby stosując przez kilka godzin barbotaż sterylnym, przefiltrowanym powietrzem.

Przygotowanie pożywki U.S. EPA

1. Dodać 1 ml każdego roztworu podstawowego wymienionego w pkt 2.1–2.7 do około 900 ml wody dejonizowanej lub destylowanej, a następnie uzupełnić do 1 l.
2. Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych sporządza się, rozpuszczając poniższe substancje w 500 ml wody dejonizowanej lub destylowanej. Odczynniki w pkt 2.1, 2.2, 2.3 oraz 2.4 można połączyć w jeden roztwór podstawowy.

2.1 $NaNO_3$ 12,750 g.

2.2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 6,082 g.

2.3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,205 g.
2.4	Roztwór podstawowy mikroskładnika odżywczego (zob. pkt 3).	
2.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	NaHCO_3	7,500 g.
2.8	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Zob. uwaga 1.

Uwaga 1: Stosować wyłącznie w odniesieniu do gatunków okrzemków używanych do badania. Można dodać bezpośrednio (202,4 mg) lub za pośrednictwem roztworu podstawowego, aby otrzymać w pożywce stężenie końcowe Si wynoszące 20 mg/l.

3. Roztwór podstawowy mikroskładników odżywczych sporządza się, rozpuszczając poniższe substancje w 500 ml wody dejonizowanej lub destylowanej:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg.
3.2	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	207,690 mg.
3.3	ZnCl_2	1,635 mg.
3.4	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	79,880 mg.
3.5	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,714 mg.
3.6	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,630 mg.
3.7	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006 mg.
3.8	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150,000 mg [sól dwusodowa kwasu etyleno-diaminotetraoctowego];
3.9	$\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005 mg Zob. uwaga 2.

Uwaga 2: Stosować tylko w pożywce dla kultur wyjściowych gatunków okrzemków.

4. Wyregulować pH do $7,5 \pm 0,1$ za pomocą 0,1 N lub 1,0 N NaOH lub HCl.
5. Przefiltrować pożywkę do sterylnego pojemnika przez filtr membranowy 0,22 mm, jeżeli ma być użyty licznik cząstek, a w przeciwnym wypadku – filtr 0,45 mm.
6. Do czasu użycia pożywkę należy przechowywać bez dostępu światła w temperaturze około 4 °C.
-

Dodatek 4

Przykład procedury hodowli glonów**Obserwacje ogólne**

Celem hodowli na podstawie niniejszej procedury jest uzyskanie hodowli glonów do badań toksyczności.

Należy zastosować odpowiednie metody, aby nie dopuścić do zainfekowania hodowli glonów bakteriami. Pożądane mogą być kultury akсенiczne, jednak należy utworzyć i używać monogatunkowej hodowli glonów.

Wszystkie czynności muszą być wykonywane w warunkach sterylnych, aby zapobiec zanieczyszczeniu bakteriami i innymi glonami.

Sprzęt i materiały

Zob. metoda badawcza: Aparatura.

Procedury otrzymywania kultur glonów

Przygotowanie roztworów składników odżywczych (pożywki):

Wszystkie sole odżywcze pożywki przygotowuje się w postaci stężonych roztworów podstawowych i przechowuje się w chłodnym miejscu bez dostępu światła. Roztwory te sterylizuje się, filtrując je lub sterylizując w autoklawie.

Pożywkę sporządza się, dodając odpowiednią ilość roztworu podstawowego do sterylnej wody destylowanej i uważając, aby nie doszło do zakażenia. Do odżywki w postaci stałej dodaje się 0,8 % agaru.

Kultura wyjściowa:

Kultury wyjściowe są to nieduże hodowle glonów, które przenosi się regularnie na świeże podłoże, tak aby pełniły rolę początkowego materiału do badań. Jeżeli hodowle nie są regularnie zużywane, rozprzestrzeniają się, tworząc pasma na ukośnych powierzchniach agaru w próbowce. Pasma przenosi się na świeże podłoże co najmniej raz na dwa miesiące.

Kultury wyjściowe hodzi się w kolbach stożkowych zawierających odpowiednią pożywkę (pojemność około 100 ml). Gdy glony inkubuje się w 20 °C przy stałym oświetleniu, przy czym wymagane jest cotygodniowe ich przenoszenie.

Podczas przenoszenia pewna ilość starej hodowli jest przenoszona za pomocą sterylnych pipet do kolby ze świeżą pożywką, tak aby początkowe stężenie gatunków charakteryzujących się szybkim wzrostem było około 100 razy mniejsze niż w starej hodowli.

Szybkość wzrostu gatunku można wyznaczyć za pomocą krzywej wzrostu. Jeżeli jest ona znana, możliwe jest oszacowanie zagęszczenia, przy którym hodowlę należy przenieść do nowej pożywki. Należy to zrobić, zanim hodowla osiągnie fazę zamierania.

Hodowla wstępna:

Celem hodowli wstępnej jest wytworzenie odpowiedniej ilości glonów nadającej się do inokulacji badanych hodowli. Hodowlę wstępną inkubuje się w warunkach badania i wykorzystuje podczas fazy wzrostu wykładniczego, zwykle po okresie inkubacji wynoszącym 2–4 dni. Hodowle glonów należy odrzucić, w przypadku gdy występują w nich komórki zdeformowane lub anormalne.

Dodatek 5

Analiza danych za pomocą regresji nieliniowej**Założenia ogólne**

Odpowiedź w badaniach glonów i badaniach wzrostu innych mikroorganizmów, czyli wzrost biomasy, ma z natury rzeczy charakter zmiennej ciągłej lub metrycznej – intensywność procesu, jeżeli zastosowano szybkość wzrostu oraz jego całkowitą po czasie, jeżeli wybrana została biomasa. Obydwa zmienne odniesione są do odpowiedniej średniej odpowiedzi nienarażonych kontrpróbek kontrolnych, wykazujących maksymalną odpowiedź w odniesieniu do narzuconych warunków, przy czym światło i temperatura stanowią podstawowe decydujące czynniki w badaniu z użyciem glonów. Układ jest rozłożony lub jednorodny, a biomasę można postrzegać jako kontinuum bez uwzględniania poszczególnych komórek. Rozkład wariancji typu odpowiedzi w takim układzie wiąże się wyłącznie z czynnikami doświadczalnymi (zwykle opisywanymi przez logarytmiczno-normalne lub normalne rozkłady błędów). Stanowi to przeciwieństwo typowych odpowiedzi pomiaru aktywności biologicznej z danymi binarnymi, w przypadku których często przyjmuje się, że dominującą składową wariancji jest tolerancja poszczególnych organizmów (zazwyczaj o rozkładzie dwumianowym). Odpowiedzi próby kontrolnej są tu na poziomie zerowym lub tła.

Jeżeli sytuacja nie jest skomplikowana, znormalizowana lub względna reakcja »r« maleje monotonicznie od 1 (zahamowanie zerowe) do 0 (zahamowanie 100-procentowe). Należy zwrócić uwagę, że ze wszystkimi reakcjami związany jest błąd i że pozorne ujemne zahamowania można obliczyć jedynie jako wynik błędu przypadkowego.

Analiza regresji*Modele*

Celem analizy regresji jest ilościowe opisanie krzywej zależności stężenie-odpowiedź w postaci matematycznej funkcji regresji $Y = f(C)$, lub części $F(Z)$, gdzie $Z = \log C$. Zastosowana jako odwrotność $C = f^{-1}(Y)$ pozwala obliczyć wielkości EC_x , w tym EC_{50} , EC_{10} i EC_{20} oraz ich 95 % granic ufności. Wykazano, że kilka prostych matematycznych postaci funkcji z powodzeniem opisuje zależności stężenie-odpowiedź uzyskiwane w badaniach nad zahamowaniem rozwoju glonów. Do funkcji tych należy na przykład równanie logistyczne, niesymetryczne równanie Weibulla oraz funkcja rozkładu logarytmiczno-normalnego, przy czym wszystkie one są krzywymi sigmoidalnymi dążącymi asymptotycznie do zera dla $C \rightarrow 0$ oraz do jedności dla $C \rightarrow$ nieskończoności.

Zaproponowano ostatnio zastosowanie modeli opartych na ciągłych funkcjach progowych (np. modelu Kooijmana »dla zahamowania wzrostu populacji«, Kooijman i in., 1996), które może też stanowić alternatywne rozwiązanie w stosunku do modeli asymptotycznych. Model ten zakłada brak efektów przy stężeniach poniżej pewnego progu, EC_0+ , który szacuje się, ekstrapolując zależności stężenie-odpowiedź w celu wyznaczenia punktu przecięcia z osią stężeń przy użyciu prostej funkcji ciągłej, która nie jest różniczkowalna w punkcie początkowym.

Należy zwrócić uwagę, że analiza ta może być prostą minimalizacją resztowych sum kwadratów odchyleń (przy założeniu stałej wariancji) albo ważonych kwadratów, jeżeli kompensowana jest heterogeniczność wariancji.

Procedura

Procedurę można opisać pokrótce w następujący sposób: wybrać odpowiednie równanie funkcyjne $Y = f(C)$ i dopasować je do danych za pomocą regresji nieliniowej. Aby uzyskać jak najwięcej informacji na podstawie danych, zamiast średnich wartości kontrprób najlepiej jest wykorzystać wyniki pomiarów wykonanych w każdej kolbie oddzielnie. Jeżeli natomiast wariancja jest wysoka, to zgodnie z praktycznym doświadczeniem średnie wartości kontrprób mogą zapewnić dokładniejszą estymację matematyczną, w mniejszym stopniu obciążoną błędami systematycznymi danych, niż to ma miejsce w przypadku zachowania każdego poszczególnego punktu danych.

Należy wykreślić dopasowaną krzywą i nanieść zmierzone dane oraz zbadać, czy dopasowanie krzywej jest odpowiednie. Narzędziem szczególnie przydatnym w tym celu może być analiza reszt. Jeżeli zależność funkcyjna wybrana w celu dopasowania zależności stężenie-odpowiedź nie opisuje dobrze całej krzywej lub istotnej jej części, takiej jak odpowiedź przy niskich stężeniach, to należy wybrać inną możliwość dopasowania krzywej – np. krzywą niesymetryczną, taką jak funkcja Weibulla, zamiast symetrycznej. Ujemne zahamowania mogą stwarzać na przykład problemy w przypadku funkcji rozkładu logarytmiczno-normalnego i również wymagać zastosowania alternatywnej funkcji regresji. Nie zaleca się przypisywania takim ujemnym wartościom zerowej lub małej dodatniej wartości, ponieważ powoduje to zniekształcenie rozkładu błędów. Aby oszacować wielkości EC_{lowx} odpowiednie może być

wykonanie oddzielnych dopasowań krzywej na częściach krzywej, takich jak część o małym zahamowaniu. Obliczyć z dopasowanego równania (za pomocą »oszacowania odwrotnego« $C = f^{-1}(Y)$) charakterystyczne oszacowania punktowe EC_x i podać oszacowanie EC_{50} jako minimum oraz jedno lub dwa oszacowania $EC_{low\ x}$. Doświadczenie wynikające z badań praktycznych wskazuje, że precyzja badania glonów zwykle umożliwia dość dokładne oszacowanie na poziomie zahamowania równym 10 %, jeżeli istnieje dostateczna liczba punktów danych, o ile przy niskich stężeniach nie występuje stymulacja, stanowiąca czynnik zakłócający. Dokładność oszacowania EC_{20} jest często znacznie większa niż EC_{10} , ponieważ EC_{20} zazwyczaj znajduje się w środkowej części krzywej zależności stężenie-odpowiedź, która jest w przybliżeniu liniowa. Niekiedy EC_{10} może być trudne w interpretacji z powodu stymulacji wzrostu. Tak więc, chociaż EC_{10} zwykle da się uzyskać z dostateczną dokładnością, zaleca się, aby w sprawozdaniu zawsze podawać również EC_{20} .

Współczynniki ważenia

Wariancja doświadczalna na ogół nie jest stała i zwykle zawiera składową proporcjonalną, a zatem korzystne jest rutynowe zastosowanie metody ważonej regresji. Do takiej analizy przyjmuje się zazwyczaj współczynniki ważenia odwrotnie proporcjonalne do wariancji:

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

Wiele programów analizy regresyjnej dopuszcza opcję ważonej analizy regresji ze współczynnikami ważenia podanymi w tabeli. Dogodne jest znormalizowanie współczynników ważenia przez pomnożenie ich przez $n/\sum W_i$ (n jest liczbą punktów danych), tak aby ich suma równała się jedności.

Normalizowanie odpowiedzi

Normalizowanie za pomocą średniej odpowiedzi próby kontrolnej stwarza pewne zasadnicze problemy i prowadzi do dość skomplikowanej struktury wariancji. Dzieląc odpowiedzi przez średnią odpowiedź próby kontrolnej w celu uzyskania procentowego poziomu zahamowania, wprowadza się dodatkowy błąd spowodowany błędem średniej kontrolnej. Współczynniki ważenia w regresji i granice ufności należy skorygować pod względem kowariancji za pomocą próby kontrolnej (Draper i Smith, 1981), chyba że błąd ten jest bardzo mały. Należy zwrócić uwagę, że wysoka dokładność oszacowanej średniej odpowiedzi próby kontrolnej jest ważna dla zminimalizowania ogólnej wariancji dla względnej odpowiedzi. Wariancja ta jest następująca:

(Indeks dolny »i« odnosi się do poziomemu stężenia »i«, a indeks dolny 0 do prób kontrolnych)

$$Y_i = \text{Odpowiedź względna} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

przy wariancji $\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \approx (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + ((\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0))$

a ponieważ $(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0$ oraz $(\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$

mając dane o rozkładzie normalnym oraz m_i i m_0 kontrprób: $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

całkowita wariancja względnej odpowiedzi, Y_i , staje się zatem:

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

Błąd średniej próby kontrolnej jest odwrotnie proporcjonalny do pierwiastka kwadratowego z liczby uśrednionych kontrprób prób kontrolnych i niekiedy uzasadnione może być uwzględnienie danych historycznych i w ten sposób znaczne zmniejszenie błędu. Alternatywna procedura nie polega na normalizowaniu danych i dopasowaniu bezwzględnych odpowiedzi, w tym danych z odpowiedzi prób kontrolnych, lecz na wprowadzeniu, jako dodatkowego parametru, wartości odpowiedzi kontrolnej, która będzie dopasowana za pomocą regresji nieliniowej. W przypadku używanego zwykle dwuparametrowego równania regresji metoda ta wymaga dopasowania trzech parametrów – a tym samym większej liczby punktów danych niż nieliniowa regresja danych – które są normalizowane za pomocą zadanej odpowiedzi próby kontrolnej.

Odwrotne przedziały ufności

Obliczanie przedziałów ufności regresji nieliniowej za pomocą oszacowania odwrotnego jest dość złożone i nie jest dostępne jako opcja standardowa w zwykłych pakietach statystycznych programów komputerowych. Przybliżone granice ufności można otrzymać za pomocą standardowych programów regresji nieliniowej z reparametryzacją (Bruce i Versteeg, 1992), co polega na przepisaniu równania matematycznego z żądanymi oszacowaniami punktowymi, np. EC_{10} i EC_{50} , jako parametrami, które mają być oszacowane. (Weźmy funkcję $I = f(\alpha, \beta, \text{stężenie})$ i wykorzystajmy definicyjne zależności $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ i $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$, aby w miejsce $f(\alpha, \beta, \text{stężenie})$ podstawić równoważną funkcję $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{stężenie})$).

Bardziej bezpośrednie obliczenie (Andersen i in. 1998) przeprowadza się, zachowując pierwotne równanie i stosując rozwinięcie w szereg Taylora wokół średnich r_i i r_0 .

Ostatnio popularne stały się metody »bootstrap«. Metody takie wykorzystują dane zmierzone oraz wielokrotne losowanie ze zwracaniem przeprowadzone za pomocą generatora liczb losowych do szacowania empirycznego rozkładu wariancji.

BIBLIOGRAFIA

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. i Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, wydanie 2. Wiley, Nowy Jork.

Bruce, R.D. i 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. i Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405–420.;

4) rozdział C.11 otrzymuje brzmienie:

„C.11. BADANIE ZAHAMOWANIA ODDYCHANIA OSADÓW CZYNNYCH (UTLENIANIE WĘGLA I AMONU)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 209 (2010). W niniejszej metodzie badawczej opisano sposób określania wpływu danej substancji chemicznej na mikroorganizmy znajdujące się w osadzie czynnym (głównie bakterie) drogą pomiarów ich intensywności oddychania (utleniania węgla lub amonu) w określonych warunkach i w obecności różnych stężeń badanej substancji chemicznej. Przedmiotowa metoda badawcza opiera się na badaniu ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry) (1) i (2), na poprzedniej wytycznej OECD nr 209 (3) oraz na zmienionej normie PN-EN ISO 8192 (4). Celem badania jest określenie szybkich metod przesiewowych w celu oceny wpływu substancji chemicznych na mikroorganizmy znajdujące się w osadzie czynnym na etapie oczyszczania biologicznego (aerobowego) w oczyszczalniach ścieków. Wyniki badania mogą posłużyć jako wskaźnik odpowiednich niehamujących stężeń badanych substancji chemicznych, które mają zostać wykorzystane w różnych badaniach biodegradowalności (na przykład w rozdziałach C.4 A–F, C.9, C.10, C.12 i C.29 niniejszego załącznika, OECD TG302C). W tym przypadku badanie można wykonać w formie badania przesiewowego, podobnego do badania ustalającego zakres stężeń lub badania granicznego stężenia (zob. pkt 39), uwzględniającego wyłącznie oddychanie w ujęciu ogólnym. W przypadku badań szybkiej biodegradowalności (rozdział C.4 lit. A–F i C.29 niniejszego załącznika), w których stężenie inokulum jest znacznie niższe niż wykorzystywane w niniejszej metodzie badawczej, do informacji tych należy jednak podchodzić ostrożnie. Brak zahamowania oddychania w tym badaniu oddychania de facto nie oznacza automatycznego wystąpienia warunków nieprowadzących do zahamowania w badaniu szybkiej biodegradowalności, opisanym w rozdziałach C.4 lit. A–F lub C.29 niniejszego załącznika.

2. Ogólnie rzecz biorąc wydaje się, że od czasu pierwszej publikacji na ten temat badanie hamowania oddychania było wykonywane z powodzeniem, chociaż w niektórych przypadkach odnotowano błędne wyniki, np. w (2) (4) (5). Krzywe obrazujące oddychanie w funkcji stężenia są niekiedy dwufazowe, wykresy zależności dawka-odpowiedź bywają zniekształcone, a wartości EC_{50} niespodziewanie niskie (5). Badania wykazały, że wyniki takie uzyskuje się, gdy osad czynny użyty w badaniach ulega znacznej nityfikacji, a badana substancja chemiczna ma większy wpływ na utlenianie amonu niż na ogólne utlenianie w wyniku działalności organizmów heterotroficznych. Wspomniane błędne wyniki można zatem wyeliminować, wykonując dodatkowe badanie z wykorzystaniem specjalnego inhibitora nityfikacji. Dokonując pomiaru wskaźników poboru tlenu w obecności takiego inhibitora, np. N-allilotiomocznika (ATU), i pod jego nieobecność, można obliczyć oddzielny, łączny pobór tlenu oraz pobór tlenu w procesach heterotroficznych i nityfikacji (4) (7) (8). Można zatem określić działanie hamujące badanej substancji chemicznej na przedmiotowe dwa procesy, a wartości EC_{50} w odniesieniu do utleniania węgla organicznego (heterotroficzność) oraz utleniania amonu (nityfikacja) można obliczyć w zwykły sposób. Należy zauważyć, że w pewnych rzadkich przypadkach działanie hamujące N-allilotiomocznika może być częściowo lub całkowicie zniesione w wyniku kompleksacji z badanymi substancjami chemicznymi lub suplementami występującymi w pożywce, np. jonami Cu^{++} (6). Jony Cu^{++} są niezbędne dla bakterii *Nitrosomonas*, ale w większym stężeniu są toksyczne.
3. Potrzeba nityfikacji w tlenowym oczyszczaniu ścieków, stanowiąca niezbędny etap w procesie usuwania związków azotu ze ścieków w wyniku denityfikacji do produktów gazowych, stała się nagłą szczególnie w państwach europejskich; UE ustaliła niższe limity stężenia azotu w oczyszczonych ściekach odprowadzanych do odbiorników wodnych (¹).
4. W większości przypadków wystarczy sama metoda oceny wpływu na procesy utleniania węgla organicznego. W niektórych przypadkach do interpretacji wyników i zrozumienia skutków potrzebne jest jednak badanie wpływu na samą nityfikację albo oddzielnie na nityfikację i na utlenianie węgla organicznego.

ZASADA METODY BADANIA

5. Intensywność oddychania próbek osadu czynnego w ściekach syntetycznych mierzy się w zamkniętej komorze, która zawiera elektrodę tlenową, po czasie kontaktu wynoszącym trzy godziny. Uwzględniając realistyczny scenariusz narażenia, odpowiedni może być dłuższy czas kontaktu. Jeżeli badana substancja chemiczna ulega szybkiej degradacji, np. abiotycznie w drodze hydrolizy, lub jest lotna i nie można utrzymać odpowiedniego stężenia, można dodatkowo zastosować krótszy okres narażenia, wynoszący np. 30 minut. Wrażliwość każdej partii osadu czynnego należy sprawdzić w dniu narażenia za pomocą odpowiedniej substancji chemicznej odniesienia. Badanie stosuje się zazwyczaj do określenia EC_x (np. EC_{50}) badanej substancji chemicznej lub stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC).
6. Zahamowanie poboru tlenu przez mikroorganizmy utleniające węgiel organiczny można wyrazić niezależnie od zahamowania poboru tlenu przez mikroorganizmy utleniające amon, mierząc intensywność poboru tlenu pod nieobecność N-allilotiomocznika, który jest specjalnym inhibitorem utleniania amonu do azotynu przez bakterie nityfikacyjne pierwszego stopnia, i w jego obecności. W tym przypadku procent zahamowania intensywności poboru tlenu oblicza się, porównując intensywność poboru tlenu w obecności badanej substancji chemicznej ze średnią intensywnością poboru tlenu odpowiednich prób kontrolnych niezawierających badanej substancji chemicznej, zarówno w obecności, jak i bez specjalnego inhibitora, tj. N-allilotiomocznika.
7. Pobór tlenu będący skutkiem procesów abiotycznych można wykryć, oznaczając intensywność poboru tlenu w mieszaninach badanej substancji chemicznej, pożywce ze ścieków syntetycznych oraz w wodzie, z pominięciem osadu czynnego.

INFORMACJE O BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

8. Dla potrzeb prawidłowej interpretacji wyników należy znać cechy badanej substancji chemicznej, takie jak identyfikacja (najlepiej numer CAS), nazwa (IUPAC), czystość, rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, lotność i adsorpcja. Lotne substancje chemiczne nie mogą być zazwyczaj badane bez zastosowania specjalnych środków ostrożności (zob. pkt 21).

(¹) Dyrektywa Rady 91/271/EWG z dnia 21 maja 1991 r. dotycząca oczyszczania ścieków komunalnych (Dz.U. L 135 z 30.5.1991, s. 40).

ZASTOSOWANIE METODY BADAWCZEJ

9. Metodę badawczą można zastosować do substancji chemicznych, które są rozpuszczalne w wodzie, słabo rozpuszczalne w wodzie lub lotne. Nie zawsze możliwe jest jednak otrzymanie wartości EC_{50} w odniesieniu do substancji chemicznych o ograniczonej rozpuszczalności, a ważne wyniki w odniesieniu do lotnych substancji chemicznych można otrzymać tylko pod warunkiem, że znaczna większość (na przykład > 80 %) badanej substancji chemicznej pozostanie w mieszaninie reakcyjnej pod koniec okresu (okresów) narażenia. W przypadku wystąpienia jakiegokolwiek niepewności co do stabilności badanej substancji chemicznej lub jej lotności, w celu bardziej precyzyjnego określenia stężenia EC_x należy przedstawić dodatkowe potwierdzające dane analityczne.

SUBSTANCJE CHEMICZNE ODNIESIENIA

10. Substancje chemiczne odniesienia należy okresowo badać, aby zapewnić wiarygodność metody badawczej i warunków badania oraz w celu sprawdzenia wrażliwości każdej partii osadu czynnego wykorzystywanej w charakterze inokulum mikroorganizmów w dniu narażenia. Zaleca się stosowanie 3,5-dichlorofenolu (3,5-DCP) jako hamującej substancji chemicznej odniesienia, ponieważ jest on znanym inhibitorem oddychania i jest wykorzystywany w wielu typach badań hamowania/toksyczności (4). Jako substancję chemiczną odniesienia do całkowitego zahamowania oddychania można również wykorzystać pięciowodny siarczan miedzi (II) (9). N-metyloanilina może być wykorzystana jako specjalny inhibitor odniesienia nitryfikacji (4).

KRYTERIA WAŻNOŚCI I ODTWARZALNOŚĆ

11. Intensywność poboru tlenu w ślepych próbach kontrolnych (bez badanej substancji chemicznej i bez substancji chemicznej odniesienia) nie powinna być mniejsza niż 20 mg tlenu na jeden gram osadu czynnego (sucha masa zawieszyny) na godzinę. Jeżeli intensywność jest mniejsza, badanie należy powtórzyć, używając wypłukanego osadu czynnego lub osadu pochodzącego z innego źródła. Współczynnik zmienności intensywności poboru tlenu w kontrpróbach kontrolnych nie powinien być wyższy niż 30 % pod koniec ostatecznego badania.
12. W 2004 r. w międzynarodowym badaniu międzylaboratoryjnym zorganizowanym przez ISO (4), w którym wykorzystano osad czynny pochodzący ze ścieków domowych, wykryto, że EC_{50} dla 3,5-DCP wynosi 2–25 mg/l w przypadku oddychania ogółem, 5–40 mg/l w przypadku oddychania w procesach heterotroficznych i 0,1–10 mg/l w procesach nitryfikacji. Jeżeli w przypadku 3,5-DCP EC_{50} nie mieści się oczekiwanym zakresie, badanie należy powtórzyć, używając osadu czynnego z innego źródła. EC_{50} dla pięciowodnego siarczanu miedzi (II) powinno wynosić 53–155 mg/l w odniesieniu do oddychania ogółem (9).

OPIS METODY BADAWCZEJ

Naczynia badawcze i aparatura badawcza

13. Należy korzystać ze zwykłego sprzętu laboratoryjnego i następujących przyrządów:
- a) naczyń badawczych – na przykład zlewki o pojemności 1 000 ml, w których znajduje się 500 ml mieszaniny reakcyjnej (zob. pkt 5 rys. 1);
 - b) komór i dodatkowych urządzeń służących do pomiaru stężenia rozpuszczonego tlenu; odpowiednie elektrody tlenowej; zamkniętej komory, w której znajduje się próbka, bez fazy nadpowierzchniowej, z urządzeniem zapisującym (np. 7, 8 i 9, rys. 1 dodatek 2); ewentualnie można wykorzystać butelkę do oznaczania BZT z odpowiednią przystawką do uszczelniania elektrody tlenowej w szyjce butelki (zob. rys. 2 dodatek 3). Aby uniknąć strat cieczy wypartej przez wprowadzaną elektrodę tlenową, zaleca się uprzednio włożyć do butelki lejek lub szklaną rurkę albo użyć naczyń o wywiniętych krawędziach. W obu przypadkach należy skorzystać z mieszanadła magnetycznego lub mieszanadła opartego na alternatywnej metodzie, np. samomieszaną sondy;
 - c) mieszadeł magnetycznych i popychaczy, pokrytych obojętnym materiałem, które wykorzystywane są w komorze pomiarowej lub w naczyniach badawczych;
 - d) urządzenia napowietrzającego: w razie potrzeby sprężone powietrze należy przepuścić przez odpowiedni filtr w celu usunięcia pyłu i oleju i przez płuczki z wodą w celu nawilżenia go. Zawartość naczyń powinna być napowietrzana za pomocą pipet Pasteura lub innych urządzeń napowietrzających, które nie wchłaniają substancji chemicznych. Aby zaspokoić zapotrzebowania osadu na tlen i rozwiązać problemy z substancjami chemicznymi, które zbyt szybko się pienią, są lotne, a zatem tracone, lub które są trudne do rozproszenia w trakcie napowietrzania tlenem, można wykorzystać wytrząsarkę orbitalną działającą przy prędkościach obrotowych w zakresie 150–250 obr./min z kolbami o pojemności np. 2 000 ml. Układ badawczy obejmuje zazwyczaj szereg napowietrzanych w sposób ciągły i kolejno nastawianych (np. w odstępach około 10–15 minut) zlewki, które są następnie kolejno analizowane. Można skorzystać również ze zweryfikowanej aparatury umożliwiającej jednoczesne napowietzanie i pomiar intensywności zużycia tlenu w mieszaninach;

- e) pehametru;
- f) wirówki, wirówki stołowej ogólnego przeznaczenia do odwirowywania osadu, osiągającej przyspieszenie $10\,000\text{ m/s}^2$.

Odczynniki

14. Przez okres całego badania należy stosować odczynniki do analiz.

Woda

15. O ile nie określono, że można używać wody wodociągowej niezawierającej chloru, należy stosować wodę destylowaną lub dejonizowaną o zawartości rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) mniejszej niż 1 mg/l .

Pożywka ze ścieków syntetycznych

16. Pożywkę należy przygotować w taki sposób, aby zawierała następujące składniki w podanych ilościach:

— pepton	16 g;
— ekstrakt mięsa (lub porównywalny ekstrakt warzywny)	11 g;
— mocznik	3 g;
— chlorek sodu (NaCl)	0,7 g;
— chlorek wapnia dwuwodny ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,4 g;
— siarczan magnezu siedmiowodny ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g;
— wodorofosforan potasu bezwodny (K_2HPO_4)	2,8 g;
— uzupełnić wodą destylowaną lub dejonizowaną do objętości 1 litra.	

17. Wartość pH tego roztworu powinna wynosić $7,5 \pm 0,5$. Jeżeli przygotowana pożywka nie zostanie niezwłocznie wykorzystana, należy ją przechowywać bez dostępu światła w temperaturze $0-4\text{ }^\circ\text{C}$ nie dłużej niż przez tydzień lub w warunkach, które nie spowodują żadnej zmiany w jej składzie. Należy zwrócić uwagę, że takie syntetyczne ścieki są 100 razy bardziej stężone niż ścieki opisane w sprawozdaniu technicznym OECD z dnia 11 czerwca 1976 r. »Proponowana metoda oceny biodegradacji substancji powierzchniowo czynnych używanych w detergentach syntetycznych«, a ponadto zawierają dodatek w postaci ortofosforanu dipotasu.
18. Innym rozwiązaniem jest sterylizacja poszczególnych składników pożywki przed przechowywaniem albo dodanie peptonu lub ekstraktu mięsa tuż przed wykonaniem badania. Przed zastosowaniem należy dokładnie wymieszać pożywkę i w razie potrzeby wyregulować pH do $7,5 \pm 0,5$.

Badana substancja chemiczna

19. Roztwór podstawowy powinien być przygotowywany w odniesieniu do substancji badanych łatwo rozpuszczalnych w wodzie wyłącznie do poziomu maksymalnej rozpuszczalności w wodzie (osady są niedopuszczalne). Substancje słabo rozpuszczalne w wodzie, mieszaniny zawierające składniki o różnej rozpuszczalności w wodzie oraz substancje adsorpcyjne należy odmierzać bezpośrednio do naczyń badawczych. W tych przypadkach zastosowanie roztworów podstawowych może stanowić alternatywę, jeżeli rozpuszczone stężenie badanych substancji chemicznych jest określone analitycznie w naczyniach badawczych (przed dodaniem osadu czynnego). Jeżeli przygotowane zostały wodne frakcje, istotne jest również analityczne oznaczenie stężeń rozpuszczonych badanych substancji chemicznych w naczyniach badawczych. Należy unikać stosowania rozpuszczalników organicznych, środków dyspergujących/emulgatorów w celu zwiększenia rozpuszczalności. Można poddawać roztwory podstawowe działaniu ultradźwięków i wstępnie mieszać zawiesiny, np. w nocy, jeżeli dostępna jest wystarczająca ilość informacji na temat stabilności badanej substancji chemicznej w takich warunkach.
20. Badana substancja chemiczna może niekorzystnie wpływać na wskaźnik pH w układzie badawczym. Przed rozpoczęciem badania, podczas badania wstępnego, należy oznaczyć pH mieszanin poddawanych działaniu badanej substancji chemicznej w celu upewnienia się, czy przed badaniem głównym wymagane będzie wyregulowanie pH; czynność tę należy powtórzyć w dniu wykonywania badania głównego. W razie potrzeby przed dodaniem inokulum należy zneutralizować wodne roztwory/zawiesiny badanej substancji chemicznej. Ponieważ jednak neutralizacja może zmienić właściwości chemiczne substancji chemicznej, w zależności od celu badania można wykonać dalsze badania, aby ocenić wpływ badanej substancji chemicznej na osad bez regulowania pH.

21. Toksyczność lotnych substancji chemicznych, w szczególności w badaniach, w których przez układ jest przepuszczane powietrze, mogą spowodować występowanie zmiennych poziomów zmian spowodowanych utratą substancji chemicznej w okresie narażenia. Należy zachować ostrożność podczas pracy z takimi substancjami, przeprowadzając szczegółową analizę substancji w mieszaninach kontrolnych zawierających daną substancję i modyfikując schemat napowietrzania.

Substancja chemiczna odniesienia

22. Jeżeli jako substancja chemiczna odniesienia stosowany jest 3,5-dichlorofenol, należy przygotować roztwór 1,00 g 3,5-dichlorofenolu w 1 000 ml wody (15). W celu przyspieszenia procesu rozpuszczania należy użyć ciepłej wody lub ultradźwięków, a po schłodzeniu do temperatury pokojowej dopełnić do kreski. Należy jednak upewnić się, czy substancja chemiczna odniesienia nie zmieniła swojej struktury chemicznej. W razie potrzeby należy sprawdzić pH roztworu i skorygować je do wartości 7–8 za pomocą NaOH lub H_2SO_4 .
23. Jeżeli w charakterze substancji chemicznej odniesienia stosowany jest pięciowodny siarczan miedzi (II), stosuje się stężenia 58 mg/l, 100 mg/l i 180 mg/l (o współczynniku 1,8). Substancję odmierza się bezpośrednio do naczyń badawczych (29 – 50 – 90 mg przy objętości całkowitej wynoszącej 500 ml). Następnie substancję rozcieńcza się 234 ml wody wodociągowej sterylizowanej w autoklawie. Pięciowodny siarczan miedzi (II) jest łatwo rozpuszczalny. Po rozpoczęciu badania dodaje się 16 ml ścieków syntetycznych i 250 ml osadu czynnego.

Specjalny inhibitor nitryfikacji

24. Należy przygotować roztwór podstawowy N-allilotiomicznika (ATU) o stężeniu 2,32 g/l. Po dodaniu 2,5 ml tego roztworu podstawowego do mieszaniny inkubacyjnej o ostatecznej objętości 500 ml otrzymane stężenie końcowe wynosi 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l), o którym wiadomo, że jest wystarczające (4) do wywołania 100 % zahamowania nitryfikacji w osadzie czynnym o działaniu nitryfikacyjnym, zawierającym 1,5 g/l zawiesiny.

Abiotyczna próba kontrolna

25. W niektórych rzadkich przypadkach badana substancja chemiczna charakteryzująca się silnymi właściwościami redukującymi może spowodować wymierne abiotyczne zużycie tlenu. W takich przypadkach niezbędne są abiotyczne próby kontrolne w celu odróżnienia abiotycznego poboru tlenu przez badaną substancję chemiczną od oddychania mikroorganizmów. Abiotyczne próby kontrolne można przygotować, pomijając dodanie inokulum w mieszaninach stosowanych w badaniu. Podobnie można włączyć do badania abiotyczne próby kontrolne bez inokulum, gdy na etapie narażenia w trakcie badania wykonywane są pomocnicze analityczne pomiary otrzymanego stężenia, np. w przypadku stosowania roztworów podstawowych substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie, zawierających składniki o różnej rozpuszczalności w wodzie. W szczególnych przypadkach niezbędne może być przygotowanie abiotycznej próby kontrolnej z inokulum poddanym sterylizacji (np. w autoklawie lub za pomocą sterylizujących substancji toksycznych). Niektóre substancje chemiczne mogą wytwarzać tlen lub zużywać go jedynie w przypadku gdy powierzchnia jest wystarczająco duża, aby zaszła reakcja, nawet jeżeli zwykle wymagane są do tego dużo wyższa temperatura lub ciśnienie. W takim przypadku szczególną uwagę należy zwrócić na substancje nadtlenowe. Inokulum poddane sterylizacji zapewnia dużą powierzchnię.

Inokulum

26. Do zastosowania ogólnego osad czynny należy pobrać na wylocie komory napowietrzania lub w pobliżu wylotu komory prawidłowo działającej oczyszczalni ścieków, do której trafiają głównie ścieki domowe. W zależności od celu badania wykorzystać można również inne odpowiednie rodzaje lub źródła osadu czynnego, np. osad wyhodowany w laboratorium, o odpowiednich stężeniach zawiesiny wynoszących 2 g/l–4 g/l. Osady pochodzące z różnych oczyszczalni ścieków mogą jednak cechować się różnymi właściwościami i różną wrażliwością.
27. Można wykorzystać osad w takiej postaci, w jakiej został pobrany, ale należy usunąć cząsteczki gruboziarniste w drodze krótkotrwałej sedimentacji, np. przez 5–15 minut, oraz zdekantować górną warstwę drobniejszej zawiesiny lub przepuścić przez sito (np. o oczkach 1 mm²). Innym rozwiązaniem jest homogenizacja osadu w wyrzäsarce przez około 15 sekund lub dłużej, ale należy zachować ostrożność ze względu na siły tnące i zmianę temperatury, które mogą wystąpić w przypadku długich okresów homogenizacji.

28. Często konieczne jest płukanie osadu, np. w przypadku niskiej intensywności oddychania endogennego. Osad należy najpierw odwirowywać przez pewien okres, np. 10 minut z przyspieszeniem około $10\,000\text{ m/s}^2$, w celu wyprodukowania czystego supernatantu i osadu cząstek stałych zawartych w ściekach. Supernatant należy usunąć, a osad dodać do odchlorowanej wody wodociągowej, wstrząsając w celu ponownego uzyskania zawiesiny, a następnie usunąć wodę płuczającą przez ponowne odwirowanie i usunięcie. W razie potrzeby należy powtórzyć proces płukania i odwirowywania. Należy oznaczyć suchą masę znanej objętości osadu ponownie doprowadzonego do stanu zawiesiny oraz osadu zagęszczonego przez usunięcie cieczy lub mocniej rozcieńczyć ten osad w odchlorowanej wodzie wodociągowej w celu uzyskania odpowiedniego stężenia ciał stałych występujących w ściekach, wynoszącego 3 g/l . Osad czynny należy stale napowietrzać (np. 2 l/min) w temperaturze badania i w miarę możliwości wykorzystywać tylko w dniu pobrania. Jeżeli nie jest to możliwe, do osadu należy codziennie doprowadzać pożywkę ze ścieków syntetycznych (50 ml pożywki ścieków syntetycznych/litr osadu czynnego) przez dwa dodatkowe dni. Osad wykorzystuje się następnie w badaniu, a wyniki akceptuje jako ważne, pod warunkiem że nie nastąpiła żadna znaczna zmiana w jego aktywności, oceniona na podstawie intensywności oddychania endogennego osadu, oddychania w procesach heterotroficznych i nityfikacji.
29. Trudności mogą pojawić się w przypadku pienienia się podczas inkubacji, które będzie tak intensywne, że piana i ciała stałe zawarte w ściekach zostaną wypchnięte z naczyń napowietrzających. W niektórych przypadkach pojawienie się piany może po prostu wynikać z obecności ścieków syntetycznych, ale należy je przewidzieć, jeżeli badana substancja chemiczna jest surfaktantem lub zawiera go w swoim składzie. Utrata części stałych osadu z mieszanin stosowanych w badaniu będzie skutkowałą sztucznie obniżoną intensywnością oddychania, która może zostać błędnie zinterpretowana jako skutek zahamowania. Ponadto napowietrzanie roztworu surfaktantu powoduje, że surfaktant gromadzi się w warstwie piany; ubytek piany z układu badawczego spowoduje obniżenie stężeń ekspozycyjnych. Pienienie można eliminować, stosując proste mechaniczne sposoby (np. mieszając od czasu do czasu ręczne za pomocą szklanej pałeczki) lub przez dodanie wolnej od surfaktantu substancji przeciwpiantwórczej w postaci silikonowej emulsji, lub stosując napowietrzanie przez wstrząsanie kolby. Jeżeli problem jest powiązany z obecnością ścieków syntetycznych, skład ścieków należy zmodyfikować, dodając odczynnik przeciwpiantwórczy w ilości np. 50 ml/l . Jeżeli pienienie powoduje badana substancja chemiczna, ilość niezbędną do zredukowania tego efektu należy określić dla maksymalnego badanego stężenia, a następnie identycznie postępować należy w przypadku wszystkich naczyń napowietrzających (w tym np. ślepych prób kontrolnych lub naczyń z substancją odniesienia, w których nie ma piany). Jeżeli zastosowane zostały substancje przeciwpiantwórcze, nie może dochodzić do interakcji z inokulum lub z badaną substancją chemiczną.

PROCEDURA BADANIA

30. Można oznaczyć zahamowanie trzech różnych procesów poboru tlenu: całkowitego, tlenu pobieranego przez mikroorganizmy heterotroficzne i poboru tlenu w wyniku nityfikacji. Zazwyczaj wystarczający powinien być pomiar zahamowania całkowitego poboru tlenu. Określenie wpływu na pobór tlenu przez mikroorganizmy heterotroficzne w wyniku utleniania węgla organicznego oraz w wyniku utleniania amoniaku jest potrzebne, jeżeli istnieje szczególny wymóg dotyczący takich dwóch oddzielnych punktów końcowych w odniesieniu do danej substancji chemicznej lub (opcjonalnie) w celu wyjaśnienia nietypowych krzywych dawka-odpowiedź wynikających z hamowania całkowitego poboru tlenu.

Warunki badania

31. Badanie należy przeprowadzić w temperaturze mieszczącej się w granicach $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Mieszaniny stosowane w badaniu

32. W celu uzyskania różnych stężeń nominalnych badanej substancji chemicznej (zob. przykład objętości składników w tabeli 1) należy przygotować stosowane w badaniu mieszaniny (F_T jak w tabeli 1) zawierające wodę, pożywkę ze ścieków syntetycznych i badaną substancję chemiczną. W razie potrzeby pH należy skorygować do poziomu $7,5 \pm 0,5$; mieszaniny należy rozcieńczyć wodą i dodać inokulum w celu uzyskania jednakowych końcowych objętości w naczyniach i rozpoczęcia napowietrzania.

Mieszaniny odniesienia

33. Mieszaniny (F_R) należy sporządzić w taki sam sposób jak mieszaniny stosowane w badaniu, zastępując badaną substancję chemiczną substancją odniesienia np. 3,5-dichlorofenolem.

Ślepe próby kontrolne

34. Ślepe próby kontrolne (F_B) należy przygotować na początku i na końcu okresu narażenia w badaniach, w których zlewki do badania nastawia się kolejno w pewnych odstępach czasu. W badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem urządzeń umożliwiających wykonanie jednoczesnych pomiarów zużycia tlenu, do każdej jednocześnie analizowanej partii należy dołączyć co najmniej dwie ślepe próby kontrolne. Ślepe próby kontrolne zawierają taką samą objętość osadu czynnego i syntetycznej pożywki, ale nie zawierają badanej substancji chemicznej ani substancji chemicznej odniesienia. Należy rozcieńczyć je wodą do takiej samej objętości jak mieszaniny stosowane w badaniu i mieszaniny odniesienia.

Abiotyczna próba kontrolna

35. W razie potrzeby, na przykład jeżeli wiadomo lub istnieje podejrzenie, że badana substancja chemiczna ma silne właściwości redukujące, należy przygotować mieszaninę F_A do pomiaru abiotycznego zużycia tlenu. Mieszanina powinna zawierać takie same ilości badanej substancji chemicznej, pożywki ze ścieków syntetycznych oraz mieć taką samą objętość jak mieszaniny stosowane w badaniu, ale nie powinna zawierać osadu czynnego.

Ogólna procedura i pomiary

36. Mieszaniny stosowane w badaniu, mieszaniny odniesienia oraz ślepe i abiotyczne próby kontrolne inkubuje się w temperaturze badania w warunkach wymuszonego napowietrzania (0,5–1 l/min) w celu utrzymania stężenia rozpuszczonego tlenu powyżej 60–70 % nasycenia oraz w celu utrzymania kłaczków osadu w zawieszeniu. Mieszanie kultur jest również konieczne w celu utrzymania kłaczków osadu w zawieszeniu. Inkubację uznaje się za rozpoczętą w momencie początkowego kontaktu inokulum z osadu czynnego z innymi składnikami końcowej mieszaniny. Pod koniec inkubacji, po określonych okresach narażenia, wynoszących zazwyczaj 3 godziny, pobiera się próbki w celu wykonania pomiaru tempa spadku stężenia rozpuszczonego tlenu w przeznaczonych do tego celu komorze (rys. 2 dodatek 3) lub w całkowicie wypełnionej butelce do oznaczania BZT. Sposób, w jaki rozpoczynają się inkubacje zależy także od wydajności urządzeń wykorzystywanych do mierzenia poziomów zużycia tlenu. Jeżeli na przykład jest to jedna sonda tlenowa, pomiary wykonuje się indywidualnie. W tym przypadku należy przygotować różne mieszaniny niezbędne do przeprowadzenia badania w ściekach syntetycznych, ale należy wstrzymania wprowadzanie inokulum i do każdego naczynia w serii dodawać należy wymagane porcje osadu. Każdą inkubację należy rozpoczynać na po kolei w dogodnych odstępach czasu, np. 10–15 minut. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie układu pomiarowego składającego się z wielu sond umożliwiających wielokrotne jednoczesne pomiary; w tym przypadku inokulum można dodać w tym samym czasie do odpowiednich grup naczyń.
37. Stężenie osadu czynnego we wszystkich mieszaninach stosowanych w badaniu, mieszaninach odniesienia i w ślepych próbach kontrolnych (ale nie w abiotycznych próbach kontrolnych) wynosi nominalnie 1,5 g/l zawiesiny. Zużycie tlenu należy zmierzyć po 3 godzinach narażenia. W razie potrzeby po 30 minutach narażenia należy wykonać dodatkowe pomiary zgodnie z wcześniejszym opisem w pkt 5.

Nitryfikacyjny potencjał osadu

38. W celu dokonania oceny, czy osad ulegnie nitryfikacji, a jeśli tak, to w jakim stopniu, należy sporządzić mieszaniny (F_B), takie jak ślepa próba kontrolna i dodatkowe mieszaniny kontrolne (F_N), które jednak zawierają również N-allotiomocznik w ilości 11,6 mg/l. Mieszaniny należy napowietrzać i inkubować w temperaturze $20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ przez 3 godziny. Następnie zmierzyć należy poziomy poboru tlenu i obliczyć poziom poboru tlenu związany z nitryfikacją.

Projekty badania

Badanie ustalające zakres stężeń

39. W razie potrzeby przeprowadza się badanie wstępne w celu oszacowania zakresu stężeń badanej substancji chemicznej potrzebnych w badaniu ostatecznym, aby oznaczyć zahamowanie zużycia tlenu. Ewentualny brak zahamowania zużycia tlenu przez badaną substancję chemiczną w badaniu wstępnym może wskazywać na brak konieczności wykonania badania ostatecznego, ale należy włączyć do badania trzy próby z najwyższymi badanymi stężeniami ze wstępnego badania (zazwyczaj 1 000 mg/l, ale zależy to od wymaganych danych).

Tabela 1

Przykłady mieszanin stosowanych w badaniu wstępnym

Odczynnik	Pierwotne stężenie				
Roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej	10 g/l				
Roztwór podstawowy syntetycznej pożywki	Zob. pkt 16				
Zawiesina podstawowa osadu czynnego	3 g/l zawiesiny				
Składniki mieszanin	Dozowanie do naczyń badawczych ^(a)				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
Roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej (ml) (pkt 19–21)	0,5	5	50	0	50
Roztwór podstawowy pożywki ze ścieków syntetycznych (ml) (pkt 16)	16	16	16	16	16
Zawiesina osadu czynnego (ml) (pkt 26–29)	250	250	250	250	0
Woda (pkt 15)	233,5	229	184	234	434
Łączna objętość mieszanin (ml)	500	500	500	500	500
Stężenia w mieszaninie					
Badana zawiesina (mg/l)	10	100	1 000	0	1 000
Osad czynny (zawiesina) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

^(a) Tę samą procedurę należy powtórzyć z chemiczną substancją odniesienia, aby uzyskać kolby F_{R1-3}.

40. Badanie należy przeprowadzić, stosując co najmniej trzy stężenia badanej substancji chemicznej, na przykład 10 mg/l, 100 mg/l i 1 000 mg/l ze ślepą próbą kontrolną oraz, w razie potrzeby, co najmniej trzy abiotyczne próby kontrolne z najwyższymi stężeniami badanej substancji chemicznej (zob. jako przykład tabelę 1). Najlepiej byłoby, gdyby najniższe stężenie nie miało żadnego wpływu na zużycie tlenu. W stosownych przypadkach należy obliczyć intensywność poboru tlenu i nityfikacji; następnie należy obliczyć procentową wartość zahamowania. W zależności od celu badania można również w prosty sposób oznaczyć toksyczność stężenia granicznego, np. 1 000 mg/l. Jeżeli przy tym stężeniu nie wystąpi żadne istotne statystycznie toksyczne działanie, dalsze badanie wyższych lub niższych stężeń nie jest konieczne. Należy zauważyć, że substancje słabo rozpuszczalne w wodzie, mieszaniny zawierające składniki o różnej rozpuszczalności w wodzie oraz substancje adsorpcyjne należy odważać bezpośrednio do naczyń badawczych. W tym przypadku objętość zarezerwowaną dla roztworu podstawowego substancji badanej należy zastąpić wodą do rozcieńczania.

*Badanie ostateczne***Hamowanie całkowitego poboru tlenu**

41. Badanie należy przeprowadzić, stosując szereg stężeń określonych na podstawie wstępnego badania. Aby otrzymać wartości NOEC i EC_x (np. EC₅₀), w większości przypadków zaleca się stosowanie sześciu prób kontrolnych i pięciu badanych stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny z pięcioma kontrolnymi. Nie ma konieczności powtarzania abiotycznej próby kontrolnej, jeżeli w badaniu wstępnym tlen nie został pobrany, jednak w przypadku znacznego poboru tlenu należy uwzględnić abiotyczne próby kontrolne w odniesieniu do każdego stężenia badanej substancji chemicznej. Wrażliwość osadu należy sprawdzić, wykorzystując do tego celu chemiczną substancję odniesienia, jaką jest 3,5-dichlorofenol. Wrażliwość osadu należy sprawdzać w każdej badanej serii, ponieważ wiadomo, że jest ona zmienna. We wszystkich przypadkach próbki usuwa się z naczyń badawczych po 3 godzinach, i w razie potrzeby po dodatkowych 30 minutach w celu pomiaru intensywności poboru tlenu w komorze z elektrodą tlenową. Na podstawie zebranych danych oblicza się szczegółowe wartości intensywności oddychowej w próbach kontrolnych i mieszaninach użytych w badaniu; następnie oblicza się procentową wartość zahamowania z poniższego równania 7.

Odróżnianie zahamowania oddychania organizmów heterotroficznych od nityfikacji

42. Wykorzystanie specjalnego inhibitora nityfikacji ATU umożliwia bezpośrednią ocenę działania hamującego badanej substancji chemicznej na utlenianie heterotroficzne i odejmując intensywność poboru tlenu w obecności ATU od całkowitego poziomu poboru (bez ATU) można obliczyć intensywność nityfikacji. Zgodnie z projektami badań EC_x lub NOEC opisanymi w pkt 41 należy przygotować dwa zestawy mieszanin reakcyjnych, ale dodatkowo do wszystkich mieszanin jednego zestawu należy dodać ATU w końcowym stężeniu 11,6 mg/l, w przypadku którego wykazano działanie całkowicie hamujące nityfikację w osadzie z zawiesiną o stężeniach do 3 000 mg/l (4). Intensywności poboru tlenu należy mierzyć po okresie narażenia; te bezpośrednie wartości są jedynie wskaźnikami oddychania organizmów heterotroficznych, a różnice między tymi wartościami i odpowiadającymi im całkowitymi wskaźnikami intensywności oddechowej określają nityfikację. Następnie oblicza się różne stopnie zahamowania.

Pomiary

43. Po okresach narażenia próbkę z pierwszego naczynia do napowietrzania należy przenieść do komory z elektrodą tlenową (rys. 1 dodatek 2) i natychmiast zmierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu. Jeżeli dostępny jest układ składający się z wielu elektrod, wówczas pomiary można wykonać jednocześnie. Istotne jest, aby tempo mieszania (za pomocą powlekanego magnezu) było takie samo jak podczas kalibracji elektrody, aby zapewnić minimalne opóźnienie odpowiedzi sondy na zmieniające się stężenia tlenu oraz umożliwić dokonywanie regularnych i odtwarzalnych pomiarów tlenu w naczyniu pomiarowym. Zazwyczaj wystarczający jest system sondy samomieszejącej niektórych elektrod tlenowych. Pomiędzy pomiarami komorę należy przepłukiwać wodą. Innym rozwiązaniem jest wykorzystanie próbki do napełnienia butelki do oznaczania BZT (rys. 2 dodatek 3) wyposażonej w mieszało magnetyczne. Sondę tlenową z przystawką należy następnie umieścić w szyjce butelki i włączyć magnetyczne mieszało. W obydwu przypadkach stężenie rozpuszczonego tlenu należy mierzyć i rejestrować w sposób ciągły zazwyczaj przez 5–10 minut lub do momentu, gdy stężenie tlenu spadnie poniżej 2 mg/l. Elektrode należy usunąć, mieszaninę umieścić z powrotem w naczyniu napowietrzającym i kontynuować napowietrzanie i mieszanie, jeżeli konieczne jest wykonanie pomiaru po dłuższych okresach narażenia.

Weryfikacja stężenia badanej substancji chemicznej

44. Do niektórych celów konieczne może być zmierzenie stężenia badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych. Należy zauważyć, że jeżeli zastosowano roztwory podstawowe:

- substancji słabo rozpuszczalnych w wodzie,
- mieszanin składników o różnej rozpuszczalności w wodzie lub
- substancji o dobrej rozpuszczalności w wodzie, ale w przypadku których stężenie roztworu podstawowego jest zbliżone do maksymalnej rozpuszczalności w wodzie,

frakcja, która uległa rozpuszczeniu, jest nieznana, i nie jest znane rzeczywiste stężenie badanej substancji chemicznej przenoszonej do naczyń badawczych. W celu scharakteryzowania narażenia konieczne jest analityczne oszacowanie stężeń badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych. Aby uprościć to zadanie, analityczne oszacowanie należy przeprowadzić przed dodaniem inokulum. Ze względu na fakt, że do naczyń badawczych zostaną przeniesione tylko rozpuszczone frakcje, zmierzone stężenia mogą być bardzo niskie.

45. Aby uniknąć czasochłonnych i kosztownych analiz laboratoryjnych, zaleca się po prostu odważyć badaną substancję chemiczną bezpośrednio do naczyń badawczych i w późniejszych obliczeniach przyjmować stężenie nominalne odważonej pierwotnie substancji. Odróżnienie rozpuszczonych, nierozpuszczonych lub adsorbowanych frakcji badanej substancji chemicznej nie jest konieczne, ponieważ wszystkie te frakcje występują w naturalnych warunkach również w oczyszczalni ścieków i mogą się różnić w zależności od składu ścieków. Celem niniejszej metody badawczej jest realistyczne oszacowanie stężenia, które nie wykazuje działania hamującego; metoda nie nadaje się do szczegółowego badania, które frakcje przyczyniają się do hamowania procesów oddychania organizmów żyjących w osadzie czynnym. Ponadto substancje adsorpcyjne również należy odważyć bezpośrednio do naczyń badawczych, które powinny być wykonane ze szkła silanizowanego, aby ograniczyć do minimum straty powodowane przez adsorpcję.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Obliczenie intensywności poboru tlenu

46. Intensywność poboru tlenu należy obliczyć ze średniej wartości pomiarowych np. z liniowej części wykresów stężenia tlenu w funkcji czasu, ograniczając się do obliczenia stężeń tlenu w zakresie 2,0–7,0 mg/l, ponieważ wyższe i niższe stężenia mogą jako takie wpływać na intensywność zużycia. Od czasu do czasu próba określenia wartości powyżej lub poniżej tego zakresu stężenia jest nieunikniona i konieczna, na przykład gdy oddychanie jest w znacznym stopniu zahamowane i w związku z tym bardzo powolne lub jeżeli w przypadku konkretnego osadu czynnego proces oddychania zachodzi bardzo szybko. Jest to dopuszczalne, pod warunkiem że fragmenty wykresu poboru tlenu poza zakresem są proste, a ich gradienty nie ulegają zmianie, gdy przechodzą przez graniczne wartości 2,0 mg/l lub 7,0 mg/l O₂. Wszystkie zakrzywione fragmenty wykresu wskazują na stabilizowanie się systemu pomiarowego lub zmianę intensywności poboru tlenu i nie należy ich wykorzystywać w celu obliczania intensywności oddychania. Intensywność poboru tlenu należy podać w miligramach na litr na godzinę (mg/lh) lub w miligramach na gram suchego osadu na godzinę (mg/gh). Intensywność zużycia tlenu R w mg/lh można obliczyć lub interpolować z liniowego fragmentu wykresu zarejestrowanego spadku zawartości tlenu zgodnie z równaniem 1:

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

gdzie:

Q_1 jest to stężenie tlenu na początku wybranej sekcji fazy liniowej (mg/l);

Q_2 jest to stężenie tlenu na końcu wybranej sekcji fazy liniowej (mg/l);

Δ_t jest to odstęp czasu pomiędzy tymi dwoma pomiarami (min).

47. Właściwą intensywność oddychania (R_s) wyraża się jako ilość tlenu zużyta na g suchej masy osadu na godzinę (mg/gh) zgodnie z równaniem 2:

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

gdzie SS stanowi stężenie zawiesiny w mieszaninie użytej w badaniu (g/l).

48. Różne indeksy R, które można łączyć, to:

S właściwa intensywność

T całkowita intensywność oddychania

N intensywność wynikająca z nitrifikacji

H intensywność wynikająca z działalności organizmów heterotroficznych

A intensywność wynikająca z procesów abiotycznych

B intensywność oparta na ślepych próbach (średnia)

Obliczenie intensywności poboru tlenu wynikającego z nitrifikacji

49. Związek między całkowitym oddychaniem (R_T), oddychaniem związanym z nitrifikacją (R_N) i oddychaniem organizmów heterotroficznych (R_H) określa równanie 3:

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

gdzie:

R_N to intensywność poboru tlenu wynikającego z nitrifikacji (mg/lh);

R_T to zmierzona intensywność poboru tlenu w ślepej próbie kontrolnej (brak ATU; F_B) (mg/lh).

R_H to zmierzona intensywność poboru tlenu w ślepej próbie kontrolnej po dodaniu ATU (F_N) (mg/lh).

50. Ta zależność jest ważna w przypadku wartości ślepych prób (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), abiotycznych grup kontrolnych (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) oraz prób z badaną substancją chemiczną (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/gh). Właściwą intensywność oddychania oblicza się z:

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

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

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

51. Jeżeli wielkość R_N jest nieznaczna (np. $< 5\%$ R_T w ślepych próbach kontrolnych) w badaniu wstępnym, można założyć, że pobór tlenu przez organizmy heterotroficzne jest równy całkowitemu poborowi i nie zachodzi nitrifikacja. Gdyby badania miały na celu ocenę wpływu na mikroorganizmy heterotroficzne i nitrifikacyjne, potrzebne byłoby inne źródło osadu czynnego. Badanie ostateczne przeprowadza się, jeżeli nie ma dowodów na hamowanie intensywności poboru tlenu przy innych stężeniach badanych substancji chemicznych.

Obliczenie procentu zahamowania

52. Procent zahamowania całkowitego zużycia tlenu, I_T , dla każdego stężenia badanej substancji chemicznej opisany jest równaniem 7:

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

53. Podobnie procent zahamowania poboru tlenu przez organizmy heterotroficzne, I_H , dla każdego stężenia badanej substancji chemicznej opisany jest równaniem 8:

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

54. Ponadto zahamowanie poboru tlenu spowodowane nitrifikacją, I_N , dla każdego stężenia opisane jest równaniem 9:

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

55. Procentowe zahamowanie poboru tlenu należy wykreślić w funkcji logarytmu stężenia badanej substancji chemicznej (krzywa zahamowania, zob. rys 3 dodatek 4). Krzywe zahamowania wyznacza się dla każdego okresu 3 godzin lub dodatkowo po 30 min. Stężenie badanej substancji chemicznej, które powoduje hamowanie poboru tlenu o 50 % (EC_{50}), należy obliczyć lub interpolować z wykresu. Jeżeli dostępne są odpowiednie dane, można obliczyć lub interpolować granice ufności na poziomie 95 % EC_{50} , nachylenie krzywej oraz odpowiednie wartości umożliwiające oznaczenie rozpoczęcia zahamowania (na przykład EC_{10} lub EC_{20}) i zakończenie zakresu zahamowania (na przykład EC_{80} lub EC_{90}).

56. Należy zauważyć, że w obliczu zmienności obserwowanej często w wynikach, w wielu przypadkach wystarczające może okazać się dodatkowe wyrażenie wyników w rzędzie wielkości na przykład:

$$EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} 1 \text{ mg/l} - 10 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} 10 \text{ mg/l} - 100 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} > 100 \text{ mg/l}$$

Interpretacja wyników

EC_x

57. Wartości EC_x , w tym ich powiązane dolne i górne granice ufności na poziomie 95 % w odniesieniu do parametru, oblicza się za pomocą odpowiednich metod statystycznych (np. analizy probitowej, krzywej logistycznej, funkcji Weibulla, uproszczonej metody Spearmana-Kärbera lub zwykłej interpolacji (11)). EC_x otrzymuje się, wstawiając wartość odpowiadającą x % średniej grupy kontrolnej do wybranego równania. Aby obliczyć EC_{50} lub każdą inną wartość EC_x , należy przeprowadzić analizę regresyjną średnich ($\bar{x}$) z okresu przed wprowadzeniem substancji chemicznej.

Oszacowanie NOEC

58. Jeżeli analiza statystyczna ma na celu wyznaczenie NOEC, niezbędne są dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń (poszczególne naczynia uznaje się za kontrpróby). Odpowiednie metody statystyczne należy stosować zgodnie z dokumentem OECD »Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application« (11). Ogólnie rzecz biorąc, niekorzystne skutki podania badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną bada się, stosując test jednostronnej (mniejszej) hipotezy na poziomie $p \leq 0,05$.

Sprawozdanie z badania

59. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna, numer CAS, czystość;
- właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej (np. $\log K_{ow}$, rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, stała Henry'ego (H) i ewentualne informacje na temat losów badanej substancji chemicznej, np. adsorpcji przez osad czynny).

Układ badawczy

- źródło, warunki działania oczyszczalni ścieków i odprowadzane do niej ścieki, stężenie, wstępna obróbka i przechowywanie osadu czynnego.

Warunki badania

- temperatura badania, pH w trakcie badania oraz czas trwania faz narażenia.

Wyniki

- specyficzne zużycie tlenu w grupach kontrolnych ($\text{mg O}_2/(\text{g osad} \times \text{h})$);
- wszystkie zmierzone dane, krzywe zahamowania oraz metoda obliczania EC_{50} ;
- EC_{50} oraz w miarę możliwości granice ufności na poziomie 95 %, ewentualnie EC_{20} , EC_{80} ; ewentualnie NOEC i zastosowane metody statystyczne, jeżeli nie można określić EC_{50} ;
- wyniki zahamowania całkowitego oraz w stosownych przypadkach zahamowania oddychania organizmów heterotroficznych i nitryfikacyjnych;
- abiotyczny pobór tlenu w fizyko-chemicznej grupie kontrolnej (jeżeli została użyta);
- nazwa chemicznej substancji odniesienia i wyniki badań z użyciem tej substancji chemicznej;
- wszelkie uwagi i odstępstwa od standardowej procedury, które mogły wpłynąć na wynik.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Brown, D., Hitz, H.R. i 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. i 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, Paryż.
 - (4) ISO (2007). ISO 8192 Jakość wody – Badanie hamowania zużycia tlenu przez osad czynny do utleniania związków zawierających węgiel i amon, Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna.
 - (5) Bealing, D. J. (2003). Dokument ISO/TC147/WG1/N.183, Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna.
 - (6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471–483.
 - (7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515–524.
 - (8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.
 - (9) Fiebig S. i 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 Jakość wody – Wytyczne dotyczące przygotowania i obróbki słabo rozpuszczalnych związków organicznych w celu oceny ich biodegradacji w środowisku wodnym, Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna.
 - (11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paryż.
-

*Dodatek 1***Definicje**

Do niniejszej metody badawczej mają zastosowanie podane poniżej definicje.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

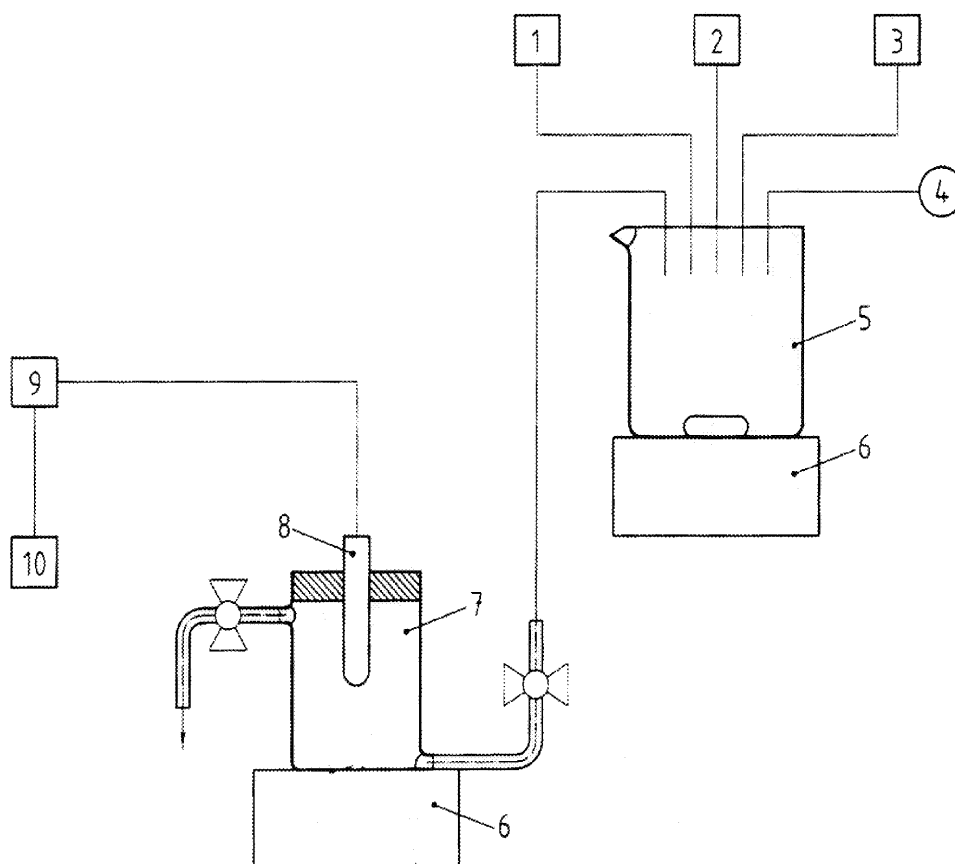
ECx (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływu na organizmy użyte do badania w danym okresie narażenia, w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC₅₀ jest stężeniem, które w przybliżeniu ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym nie obserwuje się żadnych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego skutku ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia, jeżeli porówna się je z próbą kontrolną.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Rys. 1: Przykłady układu pomiarowego

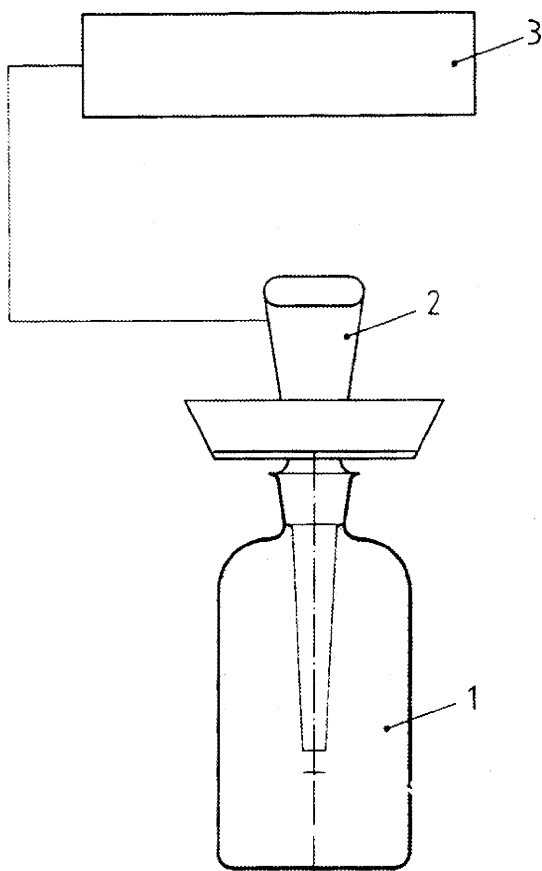


Legenda

1 osad czynny	6 mieszadło magnetyczne
2 pożywka syntetyczna	7 komora do pomiaru zmian stężenia tlenu
3 badana substancja chemiczna	8 elektroda tlenowa
4 powietrze	9 przyrząd do pomiaru stężenia tlenu
5 naczynie do mieszania	10 rejestrator

Dodatek 3

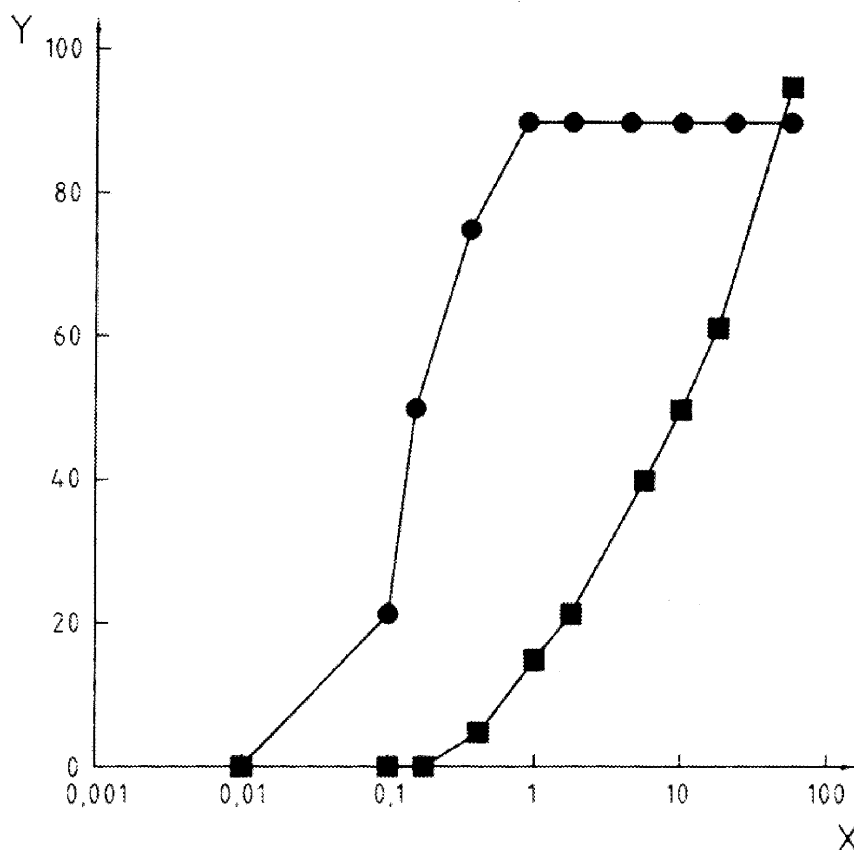
Rys. 2: Przykład układu pomiarowego z zastosowaniem butelki do oznaczania BZT

*Legenda*

- 1 naczynie badawcze
- 2 elektroda tlenowa
- 3 przyrząd do pomiaru stężenia tlenu

Dodatek 4

Rys. 3: Przykład krzywych zahamowania



Legenda

X stężenie 3,5-dichlorofenolu (mg/l)

Y zahamowanie (%)

■ zahamowanie oddychania organizmów heterotroficznych przy zastosowaniu osadu nityfikującego

● zahamowanie nityfikacji przy zastosowaniu osadu nityfikującego;

5) rozdział C.26 otrzymuje brzmienie:

„C.26 BADANIE ZAHAMOWANIA WZROSTU U GATUNKÓW LEMNA

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 221 (2006). Służy ona do oceny toksyczności substancji chemicznych w stosunku do roślin słodkowodnych rodzaju *Lemna* (rzęsy wodnej). Jej podstawę stanowią istniejące metody (1)(2)(3)(4)(5)(6), lecz obejmuje modyfikacje tych metod, uwzględniające najnowsze badania i konsultacje w sprawie szeregu zasadniczych kwestii. Niniejsza metoda badawcza została potwierdzona za pomocą międzynarodowego badania międzylaboratoryjnego (7).

2. Niniejsza metoda badawcza opisuje gatunki *Lemna gibba* i *Lemna minor*, z których obydwu zostały dogłębnie zbadane i są przedmiotem przywołanych wyżej norm. Taksonomia gatunków *Lemna* jest trudna, gdyż komplikuje ją istnienie wielu różnych fenotypów. Choć w przypadku *Lemna* może występować genetyczna zmienność pod względem reakcji na czynniki toksyczne, to obecnie istnieje zbyt mało danych na temat tego źródła zmienności, aby można było zalecić określony klon do użycia wykorzystania w ramach niniejszej metody badawczej. Należy zwrócić uwagę, że badanie nie jest przeprowadzane na kulturach aksenicznych, ale na poszczególnych etapach procedury badawczej podejmowane są kroki w celu ograniczenia zanieczyszczenia innymi organizmami do minimum.
3. Opisano szczegóły badania z wymianą (badanie półstatyczne i przepływowe) i bez wymiany (badanie statyczne) roztworu do badań. W zależności od celów badania oraz od wymogów regulacyjnych zaleca się rozważyć zastosowanie metody półstatycznej i przepływowej, np. w przypadku substancji chemicznych, które są szybko tracone z roztworu na skutek ulatniania się, fotodegradacji, strącania lub biodegradacji. Dalsze wskazówki przedstawiono w (8).
4. Zastosowane definicje są podane w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

5. Rozrastającym się wykładniczo kulturom roślinnym rodzaju *Lemna* umożliwia się wzrost w postaci monokultur z udziałem różnych stężeń badanej substancji chemicznej przez okres siedmiu dni. Celem badania jest ilościowe określenie oddziaływań substancji chemicznej na wegetatywny wzrost w tym okresie na podstawie ocen wybranych zmiennych pomiarowych. Główną zmienną pomiarową jest liczba liści. Mierzy się również co najmniej jedną inną zmienną pomiarową (całkowitą powierzchnię liści, suchą masę lub mokrą masę), gdyż niektóre substancje chemiczne mogą wpływać w o wiele większym stopniu na inne zmienne pomiarowe niż na liczbę liści. Aby określić ilościowo skutki związane z substancją chemiczną, wzrost w roztworach do badań porównuje się ze wzrostem w grupach kontrolnych i wyznacza się stężenie powodujące zahamowanie wzrostu o określone x % (np. 50 %) i wyraża się je jako EC_x (np. EC_{50}).
6. Punktem końcowym badania jest zahamowanie wzrostu wyrażone jako logarytmiczny przyrost zmiennej pomiarowej (średnia właściwa szybkość wzrostu) w okresie narażenia. Na podstawie średniej właściwej szybkości wzrostu zarejestrowanej w serii roztworów do badań wyznacza się stężenie powodujące zahamowanie szybkości wzrostu o określoną wartość procentową (np. 50 %) i wyraża się je jako E_rC_x (np. E_rC_{50}).
7. Dodatkową zmienną zależną użytą w niniejszej metodzie badawczej jest przyrost, który może być potrzebny do spełnienia określonych wymogów regulacyjnych w niektórych krajach. Jest on zdefiniowany jako zmienne pomiarowe na końcu okresu narażenia minus zmienne pomiarowe na początku okresu narażenia. Na podstawie uzysku zarejestrowanego w serii roztworów do badań oblicza się stężenie powodujące zahamowanie przyrostu o określone x % (np. 50 %) i wyraża się je jako E_yC_x (np. E_yC_{50}).
8. Ponadto można statystycznie określić najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), oraz stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

9. Należy dysponować metodą analityczną zapewniającą należyłą czułość pozwalającą na ilościowe oznaczenie substancji chemicznej w pożywce.
10. Informacje na temat badanej substancji chemicznej, które mogą być przydatne przy ustalaniu warunków badania, obejmują wzór strukturalny, czystość, rozpuszczalność w wodzie, stabilność w wodzie i świetle, stałą dysocjacji, K_{ow} , prężność pary oraz biodegradowalność. Rozpuszczalność w wodzie i prężność pary mogą posłużyć do obliczenia stałej Henry'ego, która wskaże, czy istnieje prawdopodobieństwo znaczących strat badanej substancji chemicznej w okresie badania. Pomoże to stwierdzić, czy należy podjąć szczególne działania w celu ograniczenia takich strat. W przypadku gdy dane dotyczące rozpuszczalności i stabilności badanej substancji chemicznej są niepewne, zaleca się oceniać je w warunkach badania, tj. uwzględniając pożywkę, temperaturę i warunki oświetlenia, które mają być zastosowane w badaniu.

11. Jeżeli szczególnie ważna jest kontrola pH pożywki, np. gdy bada się metale lub substancje chemiczne, które są hydrolitycznie nietrwałe, zaleca się dodać do pożywki roztwór buforowy (zob. pkt 21). Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji chemicznych o własnościach fizykochemicznych, które utrudniają ich badanie, podano w (8).

WAŻNOŚĆ BADANIA

12. Aby badanie było ważne, czas podwojenia liczby liści w próbie kontrolnej musi być krótszy niż 2,5 dnia (60 godz.), co odpowiada w przybliżeniu siedmiokrotnemu wzrostowi w ciągu siedmiu dni oraz średniej właściwej szybkości wzrostu wynoszącej $0,275 \text{ d}^{-1}$. W przypadku zastosowania pożywki i warunków badania opisanych w niniejszej metodzie badawczej, kryterium to można spełnić, stosując warunki badania statycznego (5). Przewiduje się również, że kryterium to będzie możliwe do spełnienia w warunkach badania półstatycznego i przepływowego. Obliczenie czasu podwojenia przedstawiono w pkt 49.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

13. Sposobem sprawdzenia procedury badania może być zbadanie substancji chemicznych odniesienia, takich jak 3,5-dichlorofenol stosowany w międzynarodowym badaniu międzylaboratoryjnym (7). Wskazane jest badanie chemicznej substancji odniesienia co najmniej dwa razy do roku lub równoległe z określaniem toksyczności badanej substancji chemicznej, gdy badanie jest wykonywane z mniejszą częstotliwością.

OPIS METODY

Aparatura

14. Cały sprzęt mający kontakt z pożywkami musi być wykonany ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Szklane naczynia używane do hodowli kultur i badania powinny być pozbawione zanieczyszczeń chemicznych, które mogłyby zostać wypłukane do pożywki, oraz powinny być sterylne. Naczynia badawcze powinny mieć dostateczną szerokość, aby liście różnych kolonii w naczyniach kontrolnych urosły bez zachodzenia na siebie na końcu badania. Nie ma znaczenia, czy korzenie dotykają dna naczyń badawczych, lecz zaleca się minimalną głębokość 20 mm i minimalną objętość 100 ml w każdym naczyniu badawczym. Wybór naczyń badawczych nie ma szczególnie dużego znaczenia, o ile spełnione są te wymagania. Odpowiednie okazały się szklane zlewki, krystalizatory lub szalki Petriego o odpowiednich wymiarach. Naczynia badawcze muszą być przykryte, aby ograniczyć do minimum parowanie i przypadkowe zanieczyszczenie, a jednocześnie umożliwić niezbędną wymianę powietrza. Odpowiednie naczynia badawcze, a w szczególności pokrywy, nie powinny umożliwiać zacienienia lub zmian charakterystyki widmowej światła.
15. Kultury i naczynia badawcze nie powinny być trzymane razem. Najłatwiej to osiągnąć, używając oddzielnych komór wzrostowych, inkubatorów lub pomieszczeń. Oświetlenie i temperatura muszą być regulowane i utrzymywane na stałym poziomie (zob. pkt 35–36).

Organizm użyty do badania

16. Organizmem użytym do niniejszego badania jest *Lemna gibba* lub *Lemna minor*. Krótkie opisy gatunków rzęsy wodnej, których użyto do badania toksyczności, zamieszczono w dodatku 2. Materiał roślinny można uzyskać ze zbiorów kultur, z innego laboratorium lub z terenu. Jeżeli rośliny zostały zebrane w terenie, przed użyciem należy je hodować przez co najmniej osiem tygodni w tej samej pożywce, co używana do badania. Miejsca w terenie wykorzystane do zebrania kultur wyjściowych muszą być wolne od ewidentnych źródeł zanieczyszczenia. Jeżeli zostały uzyskane z innego laboratorium lub innego zbioru kultur, należy je przechowywać w podobnych warunkach przez co najmniej trzy tygodnie. W sprawozdaniu należy zawsze podać źródło materiału roślinnego oraz gatunek i klon (jeśli jest znany) użyty w badaniu.
17. Należy używać monokultur, które są w sposób widoczny wolne od zanieczyszczenia innymi organizmami, takimi jak glony i pierwotniaki. Zdrowe rośliny *L. minor* składać się będą z kolonii zawierających od dwóch do pięciu liści, natomiast zdrowe kolonie *L. gibba* mogą mieć do siedmiu liści.
18. Jakość i jednorodność roślin użytych do badania będzie mieć znaczący wpływ na jego wynik i dlatego należy je starannie wybierać. Należy używać młodych, szybko rosnących roślin bez widocznych uszkodzeń lub odbarwień (chlorozy). O dobrej jakości kultur świadczy duża częstość występowania kolonii zawierających co najmniej dwa liście. Duża liczba pojedynczych liści oznacza stres środowiskowy, np. niedobór składników odżywczych, i materiału roślinnego z takich kultur nie należy używać do badania.

Hodowla

19. Aby zmniejszyć częstotliwość prac w zakresie utrzymania kultur (np. gdy przez pewien okres nie planuje się badań nad *Lemna*), kultury można utrzymywać w warunkach słabszego oświetlenia i obniżonej temperatury (4–10 °C). Szczegóły dotyczące kultury podano w dodatku 3. Wyraźne oznaki zanieczyszczenia glonami lub innymi organizmami mogą wymagać powierzchniowej sterylizacji podpróbki liści *Lemna*, a następnie przeniesienia jej do świeżej pożywki (zob. dodatek 3). W takim przypadku pozostałą zanieczyszczoną kulturę należy odrzucić.
20. Co najmniej siedem dni przed badaniem dostateczną ilość kolonii przenosi się aseptycznie do świeżej sterylnej pożywki i przez 7–10 dni hoduje się kulturę w warunkach badania.

Pożywka

21. Dla *Lemna minor* i *Lemna gibba* zalecane są różne pożywki, jak opisano poniżej. Należy starannie rozważyć włączenie bufora pH do pożywki (MOPS (kwasu 4-morfolinopropanosulfonowego, nr CAS 1132-61-2) w pożywce *L. minor* oraz NaHCO₃ w pożywce *L. gibba*), gdy podejrzewa się, że mógłby on reagować z badaną substancją chemiczną i wpływając na wyrażenie jej toksyczności. Dopuszczalna jest również pożywka Steinberga (9), o ile spełnione są kryteria ważności.
22. Do hodowli kultur i badania *L. minor* zalecana jest modyfikacja pożywki *Lemna* według normy szwedzkiej (SIS). Skład tej pożywki podano w dodatku 4.
23. Do hodowli kultur i badania *L. gibba* zaleca się pożywkę 20X AAP, opisaną w dodatku 4.
24. Pożywka Steinberga, opisana w dodatku 4, jest również odpowiednia dla *L. minor*, lecz może być także użyta do *L. gibba*, o ile spełnione są kryteria ważności.

Roztwory do badań

25. Roztwory do badań przygotowuje się zazwyczaj przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej przygotowuje się zwykle przez rozpuszczenie substancji w pożywce.
26. Najwyższe badane stężenie badanej substancji chemicznej zwykle nie powinno przekraczać rozpuszczalności tej substancji w wodzie w warunkach badania. Należy jednak zauważyć, że gatunki *Lemna* unoszą się na powierzchni i mogą być wystawione na działanie substancji chemicznych, które gromadzą się na granicy faz woda-powietrze (jak np. substancje słabo rozpuszczalne w wodzie lub hydrofobowe bądź substancje powierzchniowo czynne). W takiej sytuacji narażenie będzie skutkiem oddziaływania substancji innej niż będąca w roztworze i badane stężenia mogą, w zależności od charakterystyki badanej substancji chemicznej, przekroczyć rozpuszczalność w wodzie. W przypadku substancji chemicznych o niskiej rozpuszczalności w wodzie może być konieczne przygotowanie stężonego roztworu podstawowego lub dyspersji substancji chemicznej z użyciem rozpuszczalnika organicznego lub środka dyspergującego, aby ułatwić dodanie precyzyjnych ilości substancji chemicznej do pożywki oraz jej dyspersję i rozpuszczenie. Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć użycia takich materiałów. Użycie pomocniczych rozpuszczalników lub środków dyspergujących nie powinno powodować fitotoksyczności. Na przykład do powszechnie używanych rozpuszczalników, które nie powodują fitotoksyczności w stężeniach do 100 µl/l, należą aceton i dimetyloformamid. W przypadku użycia rozpuszczalnika lub środka dyspergującego w sprawozdaniu należy podać jego końcowe stężenie, które powinno być utrzymane na minimalnym poziomie (≤ 100 µl/l) i we wszystkich grupach badanych i grupach kontrolnych należy zachować takie samo stężenie rozpuszczalnika lub środka dyspergującego. Dalsze wskazówki na temat użycia środków dyspergujących podano w (8).

Grupy badane i kontrolne

27. W doborze odpowiednich badanych stężeń pomocna będzie uprzednia znajomość toksyczności badanej substancji chemicznej w stosunku do *Lemna*, np. z badania ustalającego zakres. W ostatecznym badaniu toksyczności powinno zwykle być co najmniej pięć badanych stężeń uporządkowanych w postaci szeregu geometrycznego. Współczynnik rozdziału pomiędzy badanymi stężeniami w miarę możliwości nie powinien przekraczać 3,2, lecz można zastosować większą wartość, jeżeli krzywa stężenie-odpowiedź jest płaska. Jeżeli użyto mniej niż pięć stężeń, należy podać uzasadnienie. Przy każdym badanym stężeniu należy zastosować co najmniej trzy kontrole.

28. Przy ustalaniu zakresu badanych stężeń (w przypadku badania ustalającego zakres lub ostatecznego badania toksyczności) należy wziąć pod uwagę, co następuje:
- aby określić EC_{50} , badane stężenia powinny obejmować swoim zakresem wartość EC_{50} w celu zapewnienia odpowiedniego poziomu ufności. Na przykład jeżeli oszacowuje się EC_{50} , to najwyższe badane stężenie nie powinno być większe od wartości EC_{50} . Jeżeli wartość EC_{50} leży poza zakresem badanych stężeń, to związane z tym przedziały ufności będą większe i odpowiednia ocena statystycznego dopasowania modelu może nie być możliwa;
 - jeżeli celem jest oszacowanie LOEC/NOEC, to najniższe badane stężenie powinno być dostatecznie niskie, aby wzrost nie był znacząco mniejszy niż wzrost w grupie kontrolnej. Ponadto najwyższe badane stężenie powinno być dostatecznie wysokie, aby wzrost był znacząco mniejszy niż w grupie kontrolnej. Jeśli jest inaczej, badanie musi zostać powtórzone przy zastosowaniu innego zakresu stężeń (chyba że najwyższe stężenie równe jest granicznej rozpuszczalności lub maksymalnemu wymaganemu stężeniu granicznemu np. 100 mg/l).
29. Każde badanie powinno obejmować grupy kontrolne zawierające taką samą pożywkę, liczbę liści i kolonii, warunki otoczenia i procedury jak naczynia badawcze, lecz bez badanej substancji chemicznej. Jeżeli użyty jest pomocniczy rozpuszczalnik lub środek dyspergujący, należy włączyć dodatkową grupę kontrolną z obecnością rozpuszczalnika/środka dyspergującego o tym samym stężeniu co w naczyniach z badaną substancją chemiczną. Liczba naczyń kontrolnych z kontrolną próbą (oraz, w stosownym wypadku, naczyń z rozpuszczalnikiem) powinna być co najmniej równa, a najlepiej dwukrotnie większa od liczby naczyń użytych do każdego badanego stężenia.
30. Jeżeli wyznaczenie NOEC nie jest wymagane, projekt badania można zmienić, zwiększając liczbę stężeń i zmniejszając liczbę kontrolnych przypadających na stężenie. Muszą być jednak zastosowane co najmniej trzy kontrolne próby.

Narażenie

31. Kolonie składające się z 2–4 widocznych liści przenosi się z kultury inokulum i losowo przydziela do naczyń badawczych w warunkach aseptycznych. Każde naczynie badawcze powinno zawierać łącznie 9–12 liści. Liczba liści i kolonii powinna być taka sama w każdym naczyniu. Jak wynika z doświadczenia uzyskanego dzięki tej metodzie oraz z danych z badania międzylaboratoryjnego, użycie trzech kontrolnych na zabieg, przy czym każda kontrolna zawiera początkowo 9–12 liści, jest wystarczające do wykrycia różnic we wzroście wynoszących w przybliżeniu 4–7 % zahamowania obliczonego na podstawie szybkości wzrostu (10–15 % w przypadku obliczenia na podstawie przyrostu) pomiędzy zabiegami (7).
32. Wymagany jest randomizowany układ rozmieszczenia naczyń badawczych w inkubatorze, aby ograniczyć do minimum wpływ przestrzennych różnic natężenia światła i temperatury. Podczas dokonywania obserwacji wymagany jest również zblokowany układ lub losowe przestawianie naczyń (albo ich częstsze przestawianie).
33. Jeżeli wstępny test stabilności wykazuje, że nie można utrzymać stężenia badanej substancji chemicznej (tj. mierzone stężenie spada poniżej 80 % zmierzonego początkowego stężenia) w czasie trwania badania (7 dni), zalecane są warunki badania półstatycznego. W takim przypadku kolonie należy wystawić na działanie świeżo przygotowanych roztworów do badań i roztworów kontrolnych co najmniej dwukrotnie w trakcie badania (np. w 3. i 5. dniu). Częstotliwość narażenia na świeżą pożywkę będzie zależeć od stabilności badanej substancji chemicznej; do utrzymania prawie stałych stężeń wysoce nietrwałych lub lotnych substancji chemicznych może być wymagana większa częstotliwość. W niektórych sytuacjach może być konieczna procedura przepływowa (8)(10).
34. Scenariusz narażenia poprzez nałożenie na liście (natrysk) nie jest objęty niniejszą metodą badawczą; natomiast zob. (11).

Warunki inkubacji

35. Należy zastosować ciągłe oświetlenie w postaci ciepłego lub chłodnego białego światła fluorescencyjnego o natężeniu wybranym z zakresu $85\text{--}135\text{ mE} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mierzonym w promieniowaniu fotosyntetycznie czynnym (400–700 nm) w punktach o takiej samej odległości od źródła światła co liście *Lemna* (równoważnym 6 500–10 000 luksów). Wszelkie różnice w stosunku do wybranego natężenia światła na badanej powierzchni nie powinny przekraczać $\pm 15\%$. Na wartość pomiarową będzie mieć wpływ metoda detekcji i pomiaru światła, w szczególności typ czujnika. Nad czujniki jednokierunkowe przedkładane są czujniki sferyczne (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej i poniżej płaszczyzny pomiaru) oraz czujniki »kosinusowe« (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej płaszczyzny pomiaru) i dają wyższe odczyty w przypadku opisywanego tu typu wielopunktowego źródła światła.

36. Temperatura w naczyniach badawczych powinna wynosić 24 ± 2 °C. Wartość pH pożywki kontrolnej nie powinna wzrosnąć w trakcie badania o więcej niż 1,5 jednostki. Jednakże odchylenie o więcej niż 1,5 jednostki nie spowoduje unieważnienia badania, jeśli można wykazać, że spełnione są kryteria ważności. Dodatkowej uwagi wymaga dryft pH w szczególnych przypadkach, takich jak podczas badania nietrwałych substancji lub metali. Dalsze wskazówki przedstawiono w (8).

Czas trwania

37. Badanie zostaje zakończone po 7 dniach od przeniesienia roślin do naczyń badawczych.

Pomiary i oznaczenia analityczne

38. Na początku badania liczy się i rejestruje liczbę liści w naczyniach badawczych, zwracając uwagę na uwzględnienie wystających, wyraźnie widocznych liści. Liczbę liści, które wyglądają normalnie albo nienormalnie, należy określić na początku badania, co najmniej raz na 3 dni w ciągu okresu narażenia (tj. co najmniej 2 razy podczas 7-dniowego okresu) oraz na zakończenie badania. Należy odnotować zmiany w rozwoju roślin, np. pod względem wielkości liści, wyglądu, oznak martwicy, chlorozy lub garbatości, rozpadu kolonii lub utraty zdolności utrzymywania się na powierzchni wody oraz długości i wyglądu korzeni. Należy również odnotować istotne cechy pożywki (np. obecność nierozpuszczonej substancji, wzrost glonów w naczyniu badawczym).
39. Oprócz określenia liczby liści w trakcie badania ocenia się również wpływ badanej substancji chemicznej na jedną (lub więcej) z następujących zmiennych pomiarowych:
- (i) całkowitą powierzchnię liści;
 - (ii) suchą masę;
 - (iii) mokrą masę.
40. Całkowita powierzchnia liści ma tę zaletę, że może być określona dla każdego naczynia badawczego i kontrolnego na początku, w trakcie i na koniec badania. Suchą lub mokrą masę należy określić na początku badania na podstawie próbki kultury inokulum reprezentatywnej dla tego, co jest użyte do rozpoczęcia badania, oraz na końcu badania przy użyciu materiału roślinnego z każdego naczynia badawczego i kontrolnego. Jeśli nie mierzy się powierzchni liści, to suchą masę przedkłada się nad mokrą masę.
41. Całkowitą powierzchnię liści, suchą masę i mokrą masę można wyznaczyć następująco:
- (i) *całkowita powierzchnia liści*: całkowitą powierzchnię liści wszystkich kolonii można określić za pomocą analizy obrazu. Sylwetkę naczynia badawczego i roślin można uchwycić za pomocą kamery wideo (np. ustawiając naczynie na kopioramie), a otrzymany w wyniku obraz poddać digitalizacji. Kalibrując za pomocą płaskich kształtów o znanej powierzchni, można następnie wyznaczyć całkowitą powierzchnię liści w naczyniu badawczym. Należy pamiętać, aby wykluczyć interferencję spowodowaną przez obrzeże naczynia badawczego. Alternatywne, choć bardziej pracochłonne podejście polega na wykonaniu fotokopii wszystkich naczyń badawczych i roślin, wycięciu otrzymanej sylwetki kolonii i wyznaczeniu ich powierzchni przy użyciu analizatora powierzchni liści lub papieru milimetrowego. Odpowiednie mogą być również inne techniki (np. określenie stosunku ciężaru papieru z wyciętą powierzchnią sylwetki kolonii do ciężaru papieru o powierzchni jednostkowej);
 - (ii) *sucha masa*: z każdego naczynia badawczego zbiera się wszystkie kolonie i przepłukuje wodą destylowaną lub dejonizowaną. Odsącza się je na bibule w celu usunięcia nadmiaru wody, a następnie suszy w temperaturze 60 °C do stałej masy. Należy dołączyć fragmenty korzeni. Suchą masę należy wyrazić z dokładnością do co najmniej 0,1 mg;
 - (iii) *mokra masa*: wszystkie kolonie przenosi się do uprzednio zważonych próbek z polistyrenu (lub innego obojętnego materiału) z małymi (1 mm) otworami w zaokrąglonym dnie. Następnie próbki odwirowuje się z prędkością 3 000 obr./min przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Probówki zawierające wysuszone kolonie ponownie waży się i oblicza się mokrą masę przez odjęcie ciężaru pustej próbki.

Częstotliwość pomiarów i oznaczeń analitycznych

42. Jeżeli zastosowany jest układ statyczny, należy zmierzyć pH każdego zabiegu na początku i na końcu badania. Jeżeli zastosowany jest układ półstatyczny, należy zmierzyć pH w każdej partii »świeżego« roztworu do badań przed każdą wymianą oraz w odpowiednich »zużytych« roztworach.

43. Natężenie światła należy zmierzyć w komorze wzrostowej, inkubatorze lub pomieszczeniu w różnych punktach o takiej samej odległości od źródła światła co liście *Lemna*. Pomiaru należy dokonać co najmniej raz w trakcie badania. Temperaturę pożywki w naczyniu zastępczym utrzymywanym w takich samych warunkach w komorze wzrostowej, inkubatorze lub pomieszczeniu należy rejestrować co najmniej raz dziennie.
44. Podczas badania w odpowiednich odstępach czasu oznacza się stężenia badanej substancji chemicznej. W badaniach statycznych minimalnym wymogiem jest oznaczenie stężeń na początku i na końcu badania.
45. W badaniach półstatycznych, w przypadku których nie oczekuje się, że stężenie badanej substancji chemicznej utrzyma się w granicach $\pm 20\%$ stężenia nominalnego, niezbędne jest objęcie analizą wszystkich świeżo przygotowanych roztworów do badań oraz tych samych roztworów przy każdej wymianie (zob. pkt 33). Jednakże w przypadku tych badań, w których zmierzone początkowe stężenie badanej substancji chemicznej nie mieści się w granicach $\pm 20\%$ stężenia nominalnego, lecz można dostarczyć dostatecznych dowodów wykazujących, że początkowe stężenia są powtarzalne i stabilne (tj. zawierają się w granicach 80–120 % początkowego stężenia), oznaczenia chemiczne można przeprowadzać tylko na najwyższych i najniższych badanych stężeniach. We wszystkich przypadkach oznaczenie stężeń badanej substancji chemicznej przed wymianą musi być wykonywane tylko na jednym naczyniu z kontrpróbą przy każdym badanym stężeniu (lub na połączonych zawartościach naczyń z kontrpróbą).
46. W przypadku zastosowania badania przepływowego odpowiednim systemem jest system pobierania próbek podobny do opisanego dla badań półstatycznych, wraz z analizą na początku, w trakcie i na końcu badania, lecz w tym przypadku pomiar »zużytych« roztworów nie jest odpowiedni. W tego typu badaniu należy codziennie sprawdzać natężenie przepływu roztworu roztworu i badanej substancji chemicznej lub roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej.
47. Jeżeli istnieją dowody, że stężenie badanej substancji chemicznej zostało zadowalająco utrzymane w granicach $\pm 20\%$ nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia w ciągu całego badania, to analizę wyników można oprzeć na nominalnych lub zmierzonych początkowych wartościach. Jeśli odchylenie od nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia nie mieści się w zakresie $\pm 20\%$, to analizę wyników należy oprzeć na średnim geometrycznym stężeniu w ciągu narażenia lub na modelach opisujących spadek stężenia badanej substancji chemicznej (8).

Badanie graniczne

48. W niektórych okolicznościach, na przykład gdy badanie wstępne wskazuje, że badana substancja chemiczna nie ma skutków toksycznych w stężeniach do 100 mg/l lub do jej rozpuszczalności granicznej w pożywce (w zależności od tego, która wartość jest niższa), można przeprowadzić badanie graniczne polegające na porównaniu reakcji w grupie kontrolnej i jednej grupie badanej (o stężeniu 100 mg/l lub równym granicznej rozpuszczalności). Zdecydowanie zaleca się, aby takie badanie było poparte analizą stężenia ekspozycyjnego. Do badania granicznego stosują się wszystkie wcześniej opisane warunki badania i kryteria ważności, z tym że liczba kontrprób poddawanych zabiegowi powinna zostać podwojona. Wzrost w grupie kontrolnej i grupie badanej można poddać analizie przy użyciu testu statystycznego do porównywania średnich, np. testu t-Studenta.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Czas podwojenia

49. Aby określić czas podwojenia (T_d) liczby liści oraz spełnienie przez badanie niniejszego kryterium ważności (pkt 12), używa się poniższego wzoru z danymi uzyskanymi z naczyń kontrolnych:

$$T_d = \ln 2/m$$

gdzie m jest średnią właściwą szybkością wzrostu wyznaczoną w sposób opisany w pkt 54–55.

Zmienne zależne

50. Celem badania jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na wzrost wegetatywny *Lemna*. Niniejsza metoda badawcza opisuje dwie zmienne zależne, gdyż różne jurysdykcje mają różne preferencje i potrzeby regulacyjne. Aby wyniki badania były akceptowalne we wszystkich jurysdykcjach, wpływ należy ocenić przy użyciu obydwu zmiennych zależnych a) i b) opisanych poniżej.
- a) *średnia właściwa szybkość wzrostu*: tę zmienną zależną oblicza się na podstawie zmian logarytmów liczb liści, a także na podstawie zmian logarytmów innego parametru pomiarowego (całkowitej powierzchni liści, suchej masy lub mokrej masy) w czasie (wyrażonych na dzień) w grupach kontrolnych i w każdej grupie badanej. Niekiedy określa się je mianem względnej szybkości wzrostu (12);
- b) *przyrost*: tę zmienną zależną oblicza się na podstawie zmian liczby liści, a także na podstawie zmian innego parametru pomiarowego (całkowitej powierzchni liści, suchej masy lub mokrej masy) w grupach kontrolnych i w każdej grupie badanej, do końca badania.
51. Należy zauważyć, że wartości toksyczności obliczone przy użyciu tych dwóch zmiennych zależnych nie są porównywalne i różnicę tę należy uwzględnić przy wykorzystywaniu wyników badania. Jeżeli spełnione są warunki badania określone w niniejszej metodzie badawczej, wartości EC_x oparte na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_xC_x) będą zwykle wyższe od wyników opartych na przyroście (E_yC_x) ze względu na podstawę matematyczną tych podejść. Nie należy interpretować tego jako różnicy wrażliwości pomiędzy tymi dwiema zmiennymi zależnymi, lecz jedynie jako stwierdzenie, że wartości te są różne pod względem matematycznym. Pojęcie średniej właściwej szybkości wzrostu opiera się na ogólnym przebiegu wzrostu wykładniczego rzęsy w nieograniczonych kulturach, gdzie toksyczność szacuje się na podstawie wpływu na szybkość wzrostu, przy czym nie jest ona zależna od bezwzględnego poziomu właściwej szybkości wzrostu grupy kontrolnej, nachylenia krzywej stężenie–odpowiedź ani czasu trwania badania. Natomiast wyniki oparte na zmiennej zależnej w postaci przyrostu są zależne od wszystkich tych pozostałych zmiennych. E_yC_x jest zależne od właściwej szybkości wzrostu gatunków rzęsy użytych w każdym badaniu oraz od maksymalnej właściwej szybkości wzrostu, która może być różna dla różnych gatunków, a nawet dla różnych klonów. Tej zmiennej zależnej nie powinno się używać do porównywania wrażliwości na substancje toksyczne pomiędzy gatunkami rzęsy ani nawet różnymi klonami. Choć z naukowego punktu widzenia preferuje się szacowanie toksyczności z wykorzystaniem średniej właściwej szybkości wzrostu, oszacowania toksyczności na podstawie przyrostu również objęto niniejszą metodą badawczą, aby uwzględnić obecne wymogi regulacyjne istniejące w niektórych krajach.
52. Oszacowania toksyczności powinny być oparte na liczbie liści oraz na jednej dodatkowej zmiennej pomiarowej (całkowitej powierzchni liści, suchej masie lub mokrej masie), ponieważ niektóre substancje chemiczne mogą mieć znacznie większy wpływ na inne zmienne pomiarowe niż na liczbę liści. Wpływ ten nie zostałby wykryty w wyniku obliczenia tylko liczby liści.
53. Liczbę liści, jak również każdą inną rejestrowaną zmienną pomiarową, tj. całkowitą powierzchnię liści, suchą masę lub mokrą masę, zapisuje się w postaci tabelarycznej wraz ze stężeniami badanej substancji chemicznej podczas każdego pomiaru. Późniejsza analiza danych, np. w celu oszacowania LOEC, NOEC lub EC_x , powinna być oparta na wartościach dla poszczególnych kontrprób, a nie na obliczonych średnich dla każdej grupy badanej.

Średnia właściwa szybkość wzrostu

54. Średnią właściwą szybkość wzrostu dla konkretnego okresu oblicza się jako logarytmiczny przyrost zmiennych wzrostu – liczby liści oraz jednej innej zmiennej pomiarowej (całkowitej powierzchni liści, suchej masy lub mokrej masy) – przy użyciu poniższego wzoru, dla każdej kontrpróby kontrolnej i dla każdego zabiegu:

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

gdzie:

- μ_{i-j} : średnia właściwa szybkość wzrostu od momentu i do j,
- N_i : zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie i,

- N_j : zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie j ,
- t : okres od czasu i do j .

Dla każdej grupy badanej i kontrolnej należy obliczyć średnią wartość szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji.

55. Średnią właściwą szybkość wzrostu należy obliczyć dla całego okresu badania (czas »i« w powyższym równaniu jest początkiem badania, a czas »j« jest końcem badania). Dla każdego stężenia testowego i grupy kontrolnej należy obliczyć średnią wartość średniej właściwej szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Ponadto należy ocenić szybkość wzrostu dla poszczególnych odcinków, aby określić wpływ badanej substancji chemicznej występującej w okresie narażenia (np. przez badanie krzywych wzrostu przekształconych na postać logarytmiczną). Znaczące różnice pomiędzy szybkością wzrostu dla poszczególnych odcinków a średnią szybkością wzrostu świadczą o odchyleniu od stałego wzrostu wykładniczego i uzasadniają dokładne zbadanie krzywych wzrostu. W takim przypadku zachowawczym podejściem byłoby porównanie właściwej szybkości wzrostu uzyskanej z kultur objętych badaniem w okresie maksymalnego zahamowania z właściwą szybkością wzrostu dla kultur kontrolnych w tym samym okresie.
56. Następnie można obliczyć procentowe zahamowanie tempa wzrostu (I_r) dla każdego badanego stężenia (grupy badanej) zgodnie z poniższym wzorem:

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

gdzie:

- $\% I_r$: procentowe zahamowanie średniej właściwej szybkości wzrostu;
- μ_C : średnia wartość m w grupie kontrolnej,
- μ_T : średnia wartość m w grupie badanej.

Przyrost

57. Wpływ na przyrost określa się na podstawie dwóch zmiennych pomiarowych: liczby liści oraz jednej innej zmiennej pomiarowej (całkowitej powierzchni liści, suchej masy lub mokrej masy) zmierzonych w każdym naczyniu badawczym na początku i na końcu badania. Dla suchej masy lub mokrej masy początkową biomasa określa się na podstawie próbki liści pobranej z tej samej partii użytej do zaszczepienia naczyń badawczych (zob. pkt 20). Dla każdego badanego stężenia i próby kontrolnej należy obliczyć średnią wartość przyrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Średnie procentowe zahamowanie przyrostu ($\% I_y$) można obliczyć dla każdej grupy badanej w następujący sposób:

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

gdzie:

- $\% I_y$: procentowe zmniejszenie przyrostu,
- b_c : biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy kontrolnej,
- b_T : biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy badanej.

Wykreślanie krzywych stężenie–odpowiedź

58. Należy wykreślić krzywe stężenie–odpowiedź wiążące średnie procentowe zahamowanie zmiennej zależnej (I_r lub I_y obliczone w sposób wskazany w pkt 56 lub 57) i logarytm stężenia badanej substancji chemicznej.

Oszacowanie EC_x

59. Oszacowania EC_x (np. EC_{50}) powinny być oparte zarówno na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x), jak i na przyroście (E_yC_x), z których każde powinno opierać się na liczbie liści oraz jednej dodatkowej zmiennej pomiarowej (całkowitej powierzchni liści, suchej masie lub mokrej masie). Wynika to stąd, że istnieją takie badane substancje chemiczne, które wywierają różny wpływ na liczbę liści i inne zmienne pomiarowe. Pożądanymi parametrami toksyczności są więc cztery wartości EC_x dla każdego obliczonego poziomu zahamowania x : E_rC_x (liczba liści); E_rC_x (całkowita powierzchnia liści, sucha masa lub mokra masa); E_yC_x (liczba liści); oraz E_yC_x (całkowita powierzchnia liści, sucha masa lub mokra masa).

Procedury statystyczne

60. Celem jest uzyskanie ilościowej zależności stężenie-odpowiedź za pomocą analizy regresji. Możliwe jest zastosowanie ważonej regresji liniowej po przeprowadzeniu transformacji linearyzującej danych odpowiedzi – na przykład do jednostek probit, logit albo Weibulla (13), lecz preferowane są procedury regresji nieliniowej, które lepiej sprawdzają się w przypadku nieuniknionych nieregularności danych i odchyłeń od wyrównanych rozkładów. Przy zbliżaniu się do zerowego albo całkowitego zahamowania nieregularności takie mogą zostać powiększone przez transformację, zakłócając analizę (13). Należy zwrócić uwagę, że standardowe metody analizy przy użyciu transformat probit, logit albo Weibulla są przeznaczone do stosowania do danych binarnych (np. dotyczących śmiertelności lub przeżywalności) i muszą zostać zmodyfikowane, aby uwzględnić dane dotyczące szybkości wzrostu lub przyrostu. Szczegółowe procedury wyznaczania wartości EC_x na podstawie danych ciągłych można znaleźć w (14), (15) i (16).
61. Dla każdej zmiennej zależnej, która ma być analizowana, należy zastosować zależność stężenie-odpowiedź do obliczenia oszacowań punktowych wartości EC_x . W miarę możliwości dla każdego oszacowania należy określić granice ufności na poziomie 95 %. Zgodność danych odpowiedzi z modelem regresji należy ocenić graficznie lub statystycznie. Analizę regresji należy przeprowadzić z zastosowaniem odpowiedzi z poszczególnych kontrprób, a nie średnich z grup badanych.
62. Oszacowania wartości EC_{50} i granice ufności można również otrzymać przy użyciu interpolacji liniowej z zastosowaniem metody bootstrap (17), jeżeli dostępne modele/metody regresji są nieodpowiednie do danych.
63. W celu oszacowania LOEC, a następnie NOEC, konieczne jest porównanie średnich z grup badanych przy użyciu technik analizy wariancji (ANOVA). Średnią dla każdego stężenia należy następnie porównać ze średnią kontrolną przy użyciu odpowiedniej metody wielokrotnego porównania lub testu trendu. Przydatny może być test Dunnetta lub Williamsa (18)(19)(20)(21). Należy ocenić, czy przyjęte w ANOVA założenie jednorodności wariancji nadal obowiązuje. Ocenę tę można przeprowadzić graficznie albo za pomocą formalnego testu (22). Odpowiednimi do tego celu testami są testy Levene'a lub Bartletta. Niespełnienie założenia o jednorodności wariancji można niekiedy skorygować za pomocą transformacji logarytmicznej danych. Jeżeli niejednorodność wariancji jest ekstremalna i nie można jej skorygować przez transformację, należy rozważyć analizę za pomocą takich metod jak regresyjne testy Jonckheere'a. Dodatkowe wskazówki dotyczące wyznaczania NOEC można znaleźć w (16).
64. W wyniku najnowszych osiągnięć naukowych zaleca się odstąpienie od stosowania pojęcia NOEC i zastąpienie go opartymi o regresję oszacowaniami punktowymi wartości EC_x . Dla niniejszego badania *Lemna* nie ustalono odpowiedniej wartości x . Wydaje się jednak, że odpowiedni jest przedział 10–20 % (w zależności od wybranej zmiennej zależnej), a najlepiej jest podać zarówno EC_{10} , jak i EC_{20} .

Sprawozdawczość

65. Sprawozdanie z badania musi zawierać poniższe informacje.

Badana substancja chemiczna:

- właściwości fizyczne i właściwości fizykochemiczne, w tym graniczna rozpuszczalność w wodzie,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej (np. numer CAS), w tym czystość (zanieczyszczenia).

Badany gatunek:

- nazwa systematyczna, klon (jeśli jest znany) oraz źródło.

Warunki badania:

- zastosowana procedura badawcza (statyczna, półstatyczna lub przepływowa);
- data rozpoczęcia badania i czas jego trwania;
- pożywka;
- opis projektu doświadczenia: naczynia badawcze i przykrywkę, objętości roztworów, liczba kolonii i liści przypadających na naczynie badawcze na początku badania;
- stężenia testowe (nominalne i zmierzone, gdy jest to stosowne) oraz liczba kontrprób na stężenie;
- metody przygotowywania roztworów podstawowych i roztworów do badań, w tym ewentualne zastosowanie rozpuszczalników lub środków dyspergujących;
- temperatura podczas badania;
- źródło światła, natężenie i jednorodność światła;
- wartości pH pożywki testowej i kontrolnej;
- stężenia badanej substancji chemicznej oraz metoda analizy wraz z odpowiednimi danymi oceny jakości (badania walidacyjne, odchylenia standardowe lub granice ufności analiz);
- metody określania liczby liści i innych zmiennych pomiarowych, np. suchej masy, mokrej masy lub powierzchni liści;
- wszelkie odstępstwa od niniejszej metody badawczej.

Wyniki:

- dane surowe: liczba liści oraz inne zmienne pomiarowe w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym podczas każdej obserwacji i analizy;
- średnie i odchylenia standardowe dla każdej zmiennej pomiarowej;
- krzywe wzrostu dla każdego stężenia (zalecane ze zmienną pomiarową przekształconą do postaci logarytmicznej, zob. pkt 55);
- czas podwojenia/szybkość wzrostu w grupie kontrolnej na podstawie liczby liści;
- obliczone zmienne zależne dla każdej kontrpróby poddanej zabiegowi wraz z wartościami średnimi i współczynnikiem zmienności dla kontrprób;
- graficzne przedstawienie zależności stężenie/skutek;
- oszacowania toksykologicznych punktów końcowych dla zmiennych zależnych, np. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} , oraz związane z nimi przedziały ufności. LOEC lub NOEC, jeżeli zostały obliczone, oraz metody statystyczne użyte do ich wyznaczenia;
- jeżeli zastosowano ANOVA – wielkość wpływu, który można wykryć (np. najmniejsza znacząca różnica);
- wszelka stymulacja wzrostu stwierdzona w którymkolwiek zabiegu;
- wszelkie wizualne oznaki fitotoksyczności, jak również obserwacje roztworów do badań;
- omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (ponownie zatwierdzony w 1998 r.), s. 733–742. W: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (2) US EPA – Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (1996). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8 s.
- (3) AFNOR – Association Française de Normalisation (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 s.
- (4) SSI – Szwedzki Instytut Normalizacyjny. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 s. (w języku szwedzkim).
- (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 s.
- (6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Seria raportów technicznych nr 145.
- (7) Sims I., Whitehouse P. i 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 23. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.
- (9) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ISO). 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. Raport Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych nr EPA-600/3-77 108. Wrzesień 1977.
- (11) Lockhart W. L., Billeck B. N. i 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. i 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. i Christensen E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.
- (15) Bruce R.D. i 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. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.
- (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. i Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93–96.
-

Dodatek 1

Definicje

Do celów niniejszej metody badawczej użyto następujących definicji i skrótów.

Biomasa jest to sucha masa materii żywej obecnej w populacji. W niniejszym badaniu zwykle mierzy się surogaty biomasy, takie jak liczba lub powierzchnia liści, w związku z czym określenie »biomasa« odnosi się także do tych pomiarów zastępczych.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Chloroza jest to żółknięcie tkanki liści.

Klon jest to organizm lub komórka powstałe z pojedynczego osobnika przez rozmnażanie wegetatywne. Osobniki z tego samego klonu są zatem genetycznie identyczne.

Kolonia oznacza skupisko macierzystych lub pochodnych liści (zwykle 2 do 4) przyczepionych do siebie nawzajem. Niekiedy określana jest mianem rośliny.

EC_x jest stężeniem badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w pożywce, powodującym zmniejszenie wzrostu *Lemna* o x % (np. 50 %) w danym okresie narażenia (który należy wyraźnie określić, jeśli odbiega od pełnego lub normalnego czasu trwania badania). Aby jednoznacznie oznaczyć wartość EC wynikającą z szybkości wzrostu albo z przyrostu, w odniesieniu do szybkości wzrostu używa się symbolu »E_rC«, a w odniesieniu do przyrostu – symbolu »E_yC«, po którym następuje użyta zmienna pomiarowa, np. E_rC (liczba liści).

Badanie przepływowe jest to badanie, w którym roztwory do badań są wymieniane w sposób ciągły.

Liść jest to indywidualna/pojedyncza »liściopodobna« struktura rośliny rzęsy wodnej. Jest to najmniejsza jednostka, tj. osobnik, zdolna do rozmnażania się.

Garbatość oznacza liście o wybrzuszonym lub spuchniętym wyglądzie.

Wzrost jest to przyrost zmiennej pomiarowej, np. liczby liści, suchej masy, mokrej masy lub powierzchni liści, w trakcie okresu badania.

Szybkość wzrostu (średnia właściwa szybkość wzrostu) jest to logarytmiczny przyrost biomasy w okresie narażenia.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC) jest to najniższe badane stężenie, przy którym obserwuje się, że substancja chemiczna ma statystycznie istotny wpływ na ograniczenie wzrostu (przy $p < 0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną w danym czasie narażenia. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC muszą mieć szkodliwy skutek równy lub większy niż te, które są obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy te dwa warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC).

Zmienne pomiarowe są to dowolnego typu zmienne, które mierzy się, aby wyrazić punkt końcowy badania przy użyciu jednej zmiennej zależnej lub większej ich liczby. W niniejszej metodzie zmiennymi pomiarowymi są liczba liści, powierzchnia liści, sucha masa i mokra masa.

Monokultura jest to kultura obejmująca jeden gatunek roślin.

Martwica jest to obumarła (tj. biała lub nasiąknięta wodą) tkanka liściowa.

Stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) jest to badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC.

Fenotyp są to obserwowalne cechy organizmu zdeterminowane przez oddziaływanie między jego genami a środowiskiem.

Zmienne zależne są to zmienne służące do szacowania toksyczności, uzyskane z dowolnych zmierzonych zmiennych opisujących biomasę za pomocą różnych metod obliczeniowych. W przypadku niniejszej metody badawczej zmiennymi zależnymi są szybkość wzrostu i przyrost, które otrzymuje się ze zmiennych pomiarowych, takich jak liczba liści, powierzchnia liści, sucha masa lub mokra masa.

Badanie półstatyczne (z wymianą) jest to badanie, w którym roztwór do badań jest okresowo wymieniany w określonych odstępach czasu w trakcie badania.

Badanie statyczne jest to metoda badawcza bez wymiany roztworu do badań w trakcie badania.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Punkt końcowy badania opisuje ogólny czynnik, który będzie ulegał zmianie pod wpływem badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną, co jest celem badania. W niniejszej metodzie badawczej punktem końcowym badania jest zahamowanie wzrostu, które można wyrazić za pomocą różnych zmiennych zależnych opartych na jednej zmiennej pomiarowej lub większej ich liczbie.

Pożywka jest to kompletne syntetyczne podłoże, na którym rośliny wzrastają, gdy są narażone na działanie badanej substancji chemicznej. Badana substancja chemiczna jest zwykle rozpuszczona w pożywce.

Przyrost jest to wartość zmiennej pomiarowej wyrażająca biomasę na końcu okresu narażenia minus wartość zmiennej pomiarowej na początku okresu narażenia.

Dodatek 2

Opis gatunków *Lemna*

Roślina wodna powszechnie zwana rzęsą, obejmująca gatunki *Lemna*, należy do rodziny *Lemnaceae*, na którą składa się szereg występujących na całym świecie gatunków w czterech rodzajach. Ich różny wygląd i taksonomia zostały wyczerpująco opisane (1)(2). *Lemna gibba* i *L. minor* są gatunkami reprezentatywnymi dla obszarów o klimacie umiarkowanym i są powszechnie używane do badań toksyczności. Obydwa gatunki mają pływającą lub zanurzoną tarczową łodygę (liść) i bardzo cienkie wypustki korzenia wychodzące ze środka dolnej powierzchni każdego liścia. Gatunki *Lemna* rzadko wytwarzają kwiaty i rośliny rozmnażają się wegetatywnie poprzez wytwarzanie nowych liści (3). W porównaniu do starszych roślin młode rośliny bywają zazwyczaj bledsze, mają krótsze korzenie i składają się z dwóch do trzech liści o różnych rozmiarach. Mały rozmiar gatunku *Lemna*, jego prosta budowa, wegetatywne rozmnażanie się oraz krótki czas trwania pokolenia sprawiają, że rośliny tego rodzaju są bardzo dogodnym obiektem badań laboratoryjnych (4)(5).

Z powodu prawdopodobnej zmienności międzygatunkowej pod względem wrażliwości miarodajne są jedynie porównania wrażliwości w obrębie gatunku.

Przykłady gatunków *Lemna*, które były używane do badań: literatura przedmiotu dotycząca gatunków

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. Wydział Ekologii Systemów, Uniwersytet w Sztokholmie.

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: Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8 s.

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

Szwedzki Instytut Normalizacyjny (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 s. (w języku szwedzkim).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (ponownie zatwierdzony w 1998 r.), s. 733–742.

Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8 s.

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. i in. (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.

Źródła gatunków *Lemna*

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

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

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SZWECJA
tel: +46 8 674 7240
faks: +46 8 674 7636

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

BIBLIOGRAFIA

- (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*). Tom 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zurich, Szwajcaria.
 - (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, Uniwersytet w 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.
-

Dodatek 3

Utrzymanie kultury wyjściowej

Kultury wyjściowe mogą być utrzymywane w niskich temperaturach (4–10 °C) przez dłuższy okres bez konieczności odtwarzania. Pożywka dla gatunku *Lemna* może być taka sama jak używana do badań, lecz do kultur wyjściowych można używać innych pożywek bogatych w składniki odżywcze.

Okresowo pewną liczbę młodych, jasnozielonych roślin przenosi się do zawierających świeżą pożywkę naczyń przeznaczonych na nowe kultury, stosując technikę aseptyczną. W proponowanych tu chłodniejszych warunkach wydzieloną hodowlę pochodną można prowadzić w odstępach czasu wynoszących do trzech miesięcy.

Należy używać chemicznie czystych (przepłukanych kwasem) i sterylnych naczyń na nowe kultury oraz stosować techniki aseptyczne. W razie zanieczyszczenia kultury wyjściowej, np. glonami lub grzybami, należy podjąć działania w celu wyeliminowania zanieczyszczających organizmów. W przypadku glonów i większości innych zanieczyszczających organizmów można tego dokonać przez powierzchniową sterylizację. Pobiera się próbkę zanieczyszczonego materiału roślinnego i odcina się korzenie. Następnie materiał energicznie wytrząsa się w czystej wodzie, po czym zanurza się w 0,5-procentowym (obj.) roztworze podchlorynu sodu na czas od 30 sekund do 5 minut. Materiał roślinny następnie płucze się sterylną wodą i przenosi się, w partiach, do przeznaczonych na kultury naczyń zawierających świeżą pożywkę. Wiele liści obumrze w wyniku tego zabiegu, zwłaszcza jeśli stosowane będą dłuższe okresy narażenia, lecz niektóre spośród tych, które przeżyją, będą zazwyczaj wolne od zanieczyszczenia. Liści tych można następnie użyć do ponownego zaszczepienia nowych kultur.

Dodatek 4

Pożywki

Dla *L. minor* i *L. gibba* zalecane są różne pożywki. Dla *L. minor* zaleca się zmodyfikowaną pożywkę według normy szwedzkiej (SIS), natomiast dla *L. gibba* zalecana jest pożywka 20X AAP. Skład obydwu pożywek podano poniżej. Do przygotowania tych pożywek należy użyć odczynników lub substancji chemicznych do analiz oraz wody dejonizowanej.

Pożywka dla *Lemna* według normy szwedzkiej (SIS)

- Roztwory podstawowe I–V sterylizuje się przez obróbkę w autoklawie (120 °C, 15 min.) lub za pomocą filtracji przez przeponę (o wielkości porów około 0,2 mm).
- Roztwór podstawowy VI (i opcjonalnie VII) sterylizuje się wyłącznie przez filtrację przeponową; roztworów tych nie należy obrabiać w autoklawie.
- Sterylne roztwory podstawowe należy przechowywać w warunkach chłodnych i ciemnych. Roztwory podstawowe I–V należy usunąć po sześciu miesiącach, natomiast roztwory podstawowe VI (i opcjonalnie VII) mają dopuszczalny okres przechowywania wynoszący jeden miesiąc.

Nr roztworu podstawowego	Substancja	Stężenie w roztworze podstawowym (g/l)	Stężenie w przygotowanej pożywce (mg/l)	Przygotowana pożywka	
				Pierwiastek	Stężenie w przygotowanej pożywce (mg/l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA 2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (bufor)	490	490	—	—

Aby przygotować jeden litr pożywki SIS, do 900 ml wody dejonizowanej dodaje się:

- 10 ml roztworu podstawowego I,
- 5 ml roztworu podstawowego II,
- 5 ml roztworu podstawowego III,
- 5 ml roztworu podstawowego IV,
- 1 ml roztworu podstawowego V,
- 5 ml roztworu podstawowego VI,
- 1 ml roztworu podstawowego VII (opcjonalnie).

Uwaga: Dla niektórych badanych substancji chemicznych może być potrzebny dodatkowy roztwór podstawowy VII (bufor MOPS) (zob. pkt 11).

pH reguluje się do $6,5 \pm 0,2$ przy użyciu 0,1- lub 1-molowego HCl albo NaOH, a objętość uzupełnia się do jednego litra, używając wody dejonizowanej.

Pożywka 20X AAP

Roztwory podstawowe przygotowuje się w sterylnej wodzie destylowanej lub dejonizowanej.

Sterylnie roztwory podstawowe należy przechowywać w warunkach chłodnych i ciemnych. W takich warunkach dopuszczalny okres przechowywania roztworów podstawowych wynosić będzie co najmniej 6–8 tygodni.

Dla pożywki 20X AAP przygotowuje się pięć roztworów podstawowych składników odżywczych (A1, A2, A3, B i C), używając substancji chemicznych o czystości odczynnikowej. 20 ml każdego roztworu podstawowego składników odżywczych dodaje się do około 850 ml wody dejonizowanej, tworząc pożywkę. pH reguluje się do $7,5 \pm 0,1$ przy użyciu 0,1- lub 1-molowego HCl albo NaOH, a objętość uzupełnia się do jednego litra, używając wody dejonizowanej. Pożywkę następnie przefiltrowuje się przez filtr przeponowy (około) 0,2 mm do sterylnego pojemnika.

Pożywkę przeznaczoną do badań należy przygotować 1–2 dni przed użyciem, aby pH mogło się ustabilizować. Przed użyciem należy sprawdzić i w razie potrzeby wyregulować pH pożywki przez dodanie 0,1- lub 1-molowego NaOH albo HCl, jak opisano powyżej.

Nr roztworu podstawowego	Substancja	Stężenie w roztworze podstawowym (g/ · l) (*)	Stężenie w przygotowanej pożywce (mg/ · l) (*)	Przygotowana pożywka	
				Pierwiastek	Stężenie (mg/ · l) (*)
A1	NaNO ₃	26	510	Na; N	190; 84
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	4,4	90	Ca	24,04
A2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	290	S	38,22
A3	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1,4	30	K; P	9,4; 3,7

Nr roztwo- ru podsta- wowego	Substancja	Stężenie w roztwo- rze podstawowym (g/ · l) (*)	Stężenie w przygo- towanej pożywce (mg/ · l) (*)	Przygotowana pożywka	
				Pierwiastek	Stężenie (mg/ · l) (*)
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 mg/l	Zn	31 mg/l
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,4 mg/l	29 mg/l	Co	7,1 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7,3 mg/l	145 mg/l	Mo	58 mg/l
	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,012 mg/l	0,24 mg/l	Cu	0,080 mg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na; C	220; 43

(*) O ile nie podano inaczej.

Uwaga: Teoretycznie odpowiednie końcowe stężenie wodorowęglanu (które pozwoli uniknąć znacznej regulacji pH) wynosi 15 mg/l, a nie 300 mg/l. Jednakże historyczne stosowanie odżywki 20X AAP, w tym w badaniu międzylaboratoryjnym dla niniejszej metody, oparte jest na stężeniu 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse i 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.)

Pożywka STEINBERGA (za ISO 20079)

Stężenia i roztwory podstawowe

Zmodyfikowana pożywka Steinberga zastosowana jest w ISO 20079 dla samego *Lemna minor* (gdyż tylko *Lemna minor* jest tam dopuszczony), lecz próby wykazały, iż można uzyskiwać dobre wyniki również w przypadku *Lemna gibba*.

Do przygotowania pożywki należy użyć substancji chemicznych o czystości średniej, odczynnikowej lub do analizy oraz wody dejonizowanej.

Należy przygotować odżywkę z roztworów podstawowych lub 10-krotnie zatężonej odżywki, co pozwala na maksymalne stężenie odżywki bez strącenia.

Tabela 1

Pożywka STEINBERGA o stabilizowanym pH (zmodyfikowana wg Altenburgera)

Składnik		Pożywka	
Makroelementy	masa cząsteczkowa	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41

Składnik		Pożywka	
Mikroelementy	masa cząsteczkowa	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
Sól dwusodowa EDTA, dwuwodna	372,24	1 500,00	4,03

Tabela 2

Roztwory podstawowe (makroelementy)

1. Makroelementy (zatrężone 50-krotnie)	g/l
Roztwór podstawowy 1:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
Roztwór podstawowy 2:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
Roztwór podstawowy 3:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Tabela 3

Roztwory podstawowe (mikroelementy)

2. Mikroelementy (zatrężone 1 000-krotnie)	mg/l
Roztwór podstawowy 4:	
H ₃ BO ₃	120,0
Roztwór podstawowy 5:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Roztwór podstawowy 6:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0

2. Mikroelementy (zatrężone 1 000-krotnie)	mg/l
Roztwór podstawowy 7:	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	180,0
Roztwór podstawowy 8:	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	760,00
Sól dwusodowa EDTA, dwuwodna	1 500,00

- Roztwory podstawowe 2 i 3 oraz oddzielnie 4–7 można połączyć z sobą (z uwzględnieniem wymaganych stężeń).
- Aby zapewnić dłuższy okres trwałości roztworów podstawowych, należy poddać je obróbce w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 20 min lub, alternatywnie, przeprowadzić sterylną filtrację (0,2 µm). Dla roztworu podstawowego 8 zdecydowanie zaleca się sterylną filtrację (0,2 µm).

Przygotowanie pożywki STEINBERGA (zmodyfikowanej) o stężeniu końcowym

- Dodać 20 ml roztworów podstawowych 1, 2 i 3 (zob. tabela 2) do około 900 ml wody dejonizowanej, aby uniknąć strącenia.
- Dodać 1,0 ml roztworów podstawowych 4, 5, 6, 7 i 8 (zob. tabela 3).
- pH powinno wynosić $5,5 \pm 0,2$ (wyregulować przez dodanie ograniczonej do minimum objętości roztworu NaOH lub HCl).
- Uzupełnić wodą do 1 000 ml.
- Jeżeli roztwory podstawowe są wysterylizowane i użyto odpowiedniej wody, dalsza sterylizacja nie jest konieczna. Jeżeli sterylizacji dokonuje się na końcowej pożywce, to roztwór podstawowy 8 należy dodać po obróbce w autoklawie (w temperaturze 121 °C przez 20 min).

Przygotowanie 10-krotnie zatrężonej pożywki STEINBERGA (zmodyfikowanej) do średnioterminowego przechowywania

- Dodać 20 ml roztworów podstawowych 1, 2 i 3 (zob. tabela 2) do około 30 ml wody, aby uniknąć strącenia.
- Dodać 1,0 ml roztworów podstawowych 4, 5, 6, 7 i 8 (zob. tabela 3). Uzupełnić wodą do 100 ml.
- Jeżeli roztwory podstawowe są wysterylizowane i użyto odpowiedniej wody, dalsza sterylizacja nie jest konieczna. Jeżeli sterylizacji dokonuje się na końcowej pożywce, to roztwór podstawowy 8 należy dodać po obróbce w autoklawie (w temperaturze 121 °C przez 20 min).
- pH pożywki (końcowe stężenie) powinno wynosić $5,5 \pm 0,2$;

6) dodaje się poniższe rozdziały C.31–C.46:

„C.31. BADANIE ROŚLIN ŁĄDOWYCH: BADANIE WSCHODÓW I WZROSTU SIEWEK

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 208 (2006). Okresowo dokonuje się przeglądu metod badawczych w świetle postępu naukowego i możliwości zastosowania do użytku regulacyjnego. Niniejsza zaktualizowana metoda badawcza ma służyć ocenie potencjalnego wpływu substancji chemicznych na wschody i wzrost siewek. W związku z tym nie obejmuje ona wpływu długoterminowego ani wpływu na rozrodczość (tj. zawiązywanie nasion, tworzenie kwiatów, dojrzewanie owoców). Należy uwzględnić warunki narażenia i właściwości badanej substancji chemicznej, aby upewnić się, że stosowane są odpowiednie metody badawcze (np. w przypadku badania metali/związków metali należy uwzględnić wpływ pH i powiązanych przeciwjonów) (1). Niniejsza metoda badawcza nie dotyczy roślin narażonych na działanie oparów substancji chemicznych. Przedmiotowa metoda badawcza ma zastosowanie do badania substancji chemicznych ogólnego zastosowania, produktów biobójczych i środków ochrony roślin (znanych również jako pestycydy). Metodę opracowano na podstawie istniejących metod (2) (3) (4) (5) (6) (7). Uwzględniono również inne odniesienia istotne dla badania roślin (8) (9) (10). Zastosowane definicje są podane w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

2. W badaniu ocenia się wpływ na wschody siewek i wczesny wzrost wyższych roślin po narażeniu na badaną substancję chemiczną w glebie (albo innej odpowiedniej matrycy gleby). Nasiona umieszcza się w kontakcie z glebą, do której wprowadzono badaną substancję chemiczną, i ocenia pod kątem skutków zwykle po upływie 14–21 dni, gdy wszędzie 50 % siewek w grupie kontrolnej. Pomiar punktów końcowych polega na wizualnej ocenie wschodów siewek, suchej masy kiełków (ewentualnie mokrej masy kiełków) oraz, w niektórych przypadkach, wysokości kiełków, jak również na ocenie widocznego szkodliwego wpływu na różne części rośliny. Uzyskane pomiary i obserwacje porównuje się z pomiarami i obserwacjami dotyczącymi roślin z grupy kontrolnej niepoddanej zabiegowi.
3. W zależności od oczekiwanej drogi narażenia badaną substancję chemiczną łączy się z glebą (lub ewentualnie ze sztuczną matrycą gleby) albo umieszcza na jej powierzchni, co prawidłowo odzwierciedla potencjalną drogę narażenia na substancję chemiczną. Łączenie z glebą polega na wprowadzaniu do gleby luzem. Po wprowadzeniu glebę przenosi się do doniczek, a następnie wysiewa się do niej nasiona danego gatunku rośliny. Podanie powierzchniowe odbywa się na glebę umieszczoną w doniczkach, do której wysiano już nasiona. Zestawy badawcze (próby kontrolne i glebę poddaną zabiegowi wraz z nasionami) umieszcza się następnie w odpowiednich warunkach sprzyjających kiełkowaniu/wzrostowi roślin.
4. Badanie można przeprowadzić w celu wyznaczenia krzywej dawka-odpowiedź albo przy jednym stężeniu/poziomie jako badanie graniczne, w zależności od celu badania. Jeżeli wyniki badania przeprowadzonego przy jednym stężeniu/poziomie przekraczają określony poziom toksyczności (np. jeśli obserwowany jest wpływ większy niż x %), przeprowadza się badanie ustalające zakres, aby określić górne i dolne limity toksyczności, a następnie badanie przy wielu stężeniach/poziomach w celu uzyskania krzywej dawka-odpowiedź. Stosuje się odpowiednią analizę statystyczną w celu uzyskania stężenia efektywnego x % lub wskaźnika efektywnego stosowania ER_x (np. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) w odniesieniu do najbardziej wrażliwego parametru lub parametrów będących przedmiotem zainteresowania. Ponadto w niniejszym badaniu można obliczyć najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), oraz najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

5. Poniższe informacje są przydatne do ustalenia oczekiwanej drogi narażenia na substancję chemiczną oraz przy opracowywaniu badania: wzór strukturalny, czystość, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, współczynnik podziału 1-oktanol/woda, sorpcyjne właściwości gleby, prężność pary, trwałość w wodzie i pod działaniem światła oraz biodegradowalność.

WAŻNOŚĆ BADANIA

6. Aby badanie było ważne, muszą być spełnione następujące kryteria wykonania w próbach kontrolnych:
 - wschody siewek muszą wynieść co najmniej 70 %;
 - siewki nie przejawiają widocznych oznak fitotoksyczności (np. chlorozy, martwicy, więdnienia, deformacji liści i łodygi), a rośliny przejawiają wyłącznie wahania w zakresie wzrostu i morfologii typowe dla danego gatunku;
 - średnia przeżywalność wczesnych siewek z próby kontrolnej wynosi co najmniej 90 % w okresie badania;
 - warunki otoczenia dla danego gatunku są identyczne i pożywka zawiera taką samą ilość matrycy gleby, pożywki pomocniczej lub podłoża z tego samego źródła.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

7. Substancję chemiczną odniesienia można badać w regularnych odstępach czasu, aby upewnić się, że wynik badania i reakcja danych badanych roślin oraz warunki badania nie uległy znacznej zmianie w czasie. Ewentualnie można wykorzystać historyczne pomiary biomasy lub wzrostu w próbach kontrolnych w celu dokonania oceny wyników układu badawczego w określonych laboratoriach; mogą one posłużyć jako międzylaboratoryjny pomiar jakości prób kontrolnych.

OPIS METODY

Gleba naturalna – podłoże sztuczne

8. Rośliny można uprawiać w doniczkach wypełnionych gliną piaszczystą, piaskiem gliniastym lub gliną piaszczysto-ilastą o zawartości węgla organicznego do 1,5 % (około 3 % materii organicznej). Można również zastosować dostępną na rynku ziemię doniczkową lub syntetyczną mieszankę glebową o zawartości węgla organicznego do 1,5 %. Nie należy stosować gleb gliniastych, jeżeli wiadomo, że badana substancja chemiczna ma wysokie powinowactwo do glin. Glebę z pola należy przesiać do cząstek o wielkości 2 mm, tak aby ją ujednolodzić i usunąć cząstki gruboziarniste. Należy odnotować rodzaj i teksturę gleby, zawartość procentową węgla organicznego, pH i zawartość soli, jak również przewodnictwo elektryczne ostatecznie przygotowanej gleby. Glebę należy sklasyfikować zgodnie ze standardowym schematem klasyfikacji (11). Glebę można poddać pasteryzacji lub obróbce cieplnej w celu zmniejszenia wpływu patogenów występujących w glebie.
9. Naturalna gleba może utrudnić interpretację wyników i zwiększyć ich zmienność ze względu na zróżnicowane właściwości fizyczne/chemiczne i populacje mikrobiologiczne. Z kolei te zmienne modyfikują zdolność zatrzymywania wilgoci, efekt wiązania chemicznego, napowietrzenie oraz zawartość składników odżywczych i pierwiastków śladowych. Poza różnicami w zakresie wspomnianych czynników fizycznych będą również występowały różnice we właściwościach chemicznych, takich jak pH i potencjał redoks, co może wpłynąć na biodostępność badanej substancji chemicznej (12) (13) (14).
10. Podłoża sztuczne zazwyczaj nie są stosowane do badania środków ochrony roślin, ale można je wykorzystywać do badania substancji chemicznych ogólnego zastosowania albo w przypadku gdy wskazane jest zmniejszenie zmienności powodowanej przez naturalne gleby i zwiększenie porównywalności wyników badania. Zastosowane podłoża powinny składać się z obojętnych materiałów, które minimalizują oddziaływanie z badaną substancją chemiczną, nośnikiem rozpuszczalnikowym lub obydwoma tymi elementami. Ustalono, że odpowiednimi obojętnymi materiałami, które w minimalnym stopniu absorbują badaną substancję chemiczną (15), zapewniając maksymalną dostępność substancji chemicznej dla siewki poprzez pobieranie przez korzenie, są piasek kwarcowy przemyty kwasem, wełna mineralna oraz kulki szklane (np. o średnicy 0,35–0,85 mm). Nieodpowiednimi podłożami będą między innymi vermikulit, perlit albo inne wysoce absorpcyjne materiały. Należy zapewnić składniki odżywcze wspomagające wzrost rośliny, aby zagwarantować, że rośliny nie znajdują się w warunkach stresowych ze względu na niedobór składników odżywczych, i w razie potrzeby należy to ocenić za pomocą analizy chemicznej lub wizualnej oceny roślin z próby kontrolnej.

Kryteria doboru badanych gatunków

11. Zakres wybranych gatunków powinien być w miarę możliwości szeroki, np. uwzględniający ich zróżnicowanie taksonomiczne w królestwie roślin, rozmieszczenie, liczebność, charakterystykę cyklu życiowego danego gatunku oraz region występowania w naturze, tak aby uzyskać pewien zakres odpowiedzi (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Przy doborze badanych gatunków należy wziąć pod uwagę następujące cechy możliwych gatunków:
 - gatunki mają jednolite nasiona, które można łatwo uzyskać ze standardowych źródeł nasion i które zapewniają powtarzalne, niezawodne i równe kiełkowanie, jak również jednolity wzrost siewek;
 - roślina jest odpowiednia do badań w laboratorium i może dawać wiarygodne i powtarzalne wyniki na tych samych i różnych urządzeniach badawczych;
 - wrażliwość gatunku wykorzystywanego do badań powinna być spójna z reakcjami roślin znalezionych w otoczeniu i wystawionych na działanie substancji chemicznej;
 - zostały one wykorzystane w pewnym stopniu we wcześniejszych badaniach toksyczności i ich wykorzystanie na przykład w pomiarach aktywności biologicznej herbicydów, badaniu przesiewowym na obecność metali ciężkich, badaniach zasolenia lub niedoboru składników mineralnych lub badaniach allelopatii wskazuje na wrażliwość na szereg różnorodnych stresorów;
 - są zgodne z warunkami wzrostu określonymi w metodzie badawczej;
 - spełniają kryteria ważności badania.

Niektóre z badanych gatunków, które historycznie najczęściej wykorzystywano do badań, są wymienione w dodatku 2, zaś potencjalne gatunki nieużywane do upraw znajdują się w dodatku 3.

12. Liczba gatunków, które zostaną objęte badaniem, zależy od odpowiednich wymogów regulacyjnych, w związku z czym nie jest określona w niniejszej metodzie badawczej.

Zastosowanie badanej substancji chemicznej

13. Substancję chemiczną należy wprowadzić w odpowiednim nośniku (np. wodzie, acetonie, etanolu, glikolu polietylenowym, gumie arabskiej, piasku). Badanie może również obejmować mieszaniny (produkty gotowe do stosowania lub preparaty) zawierające substancje czynne i różne adiuwanty.

Wprowadzenie do gleby / podłoża sztucznego

14. Substancje chemiczne, które są rozpuszczalne w wodzie lub zawieszone w wodzie, można dodać do wody, a następnie otrzymany roztwór miesza się z glebą w odpowiednim urządzeniu mieszającym. Tego rodzaju badanie może być odpowiednie, jeżeli narażenie na substancję chemiczną następuje za pośrednictwem gleby lub glebowej wody porowej oraz jeżeli istnieją obawy dotyczące pobierania przez korzenie. Dodanie badanej substancji chemicznej nie powinno powodować przekroczenia pojemności wodnej gleby. Objętość dodanej wody powinna być taka sama dla każdego badanego stężenia, ale powinna być ograniczona, aby zapobiec zbrylaniu się gleby.
15. Substancje chemiczne o niższej rozpuszczalności w wodzie należy rozpuścić w odpowiednim lotnym rozpuszczalniku (np. acetonie, etanolu) i wymieszać z piaskiem. Następnie rozpuszczalnik można usunąć z piasku, kierując strumień powietrza i jednocześnie stale mieszając piasek. Tak przygotowany piasek miesza się z glebą doświadczalną. Do drugiej próby kontrolnej dodaje się tylko piasek i rozpuszczalnik. Do wszystkich poziomów zabiegu i drugiej próby kontrolnej dodaje się równe ilości piasku z włączonym i usuniętym rozpuszczalnikiem. W przypadku nierozpuszczalnych badanych substancji chemicznych będących ciałami stałymi suchą glebę i substancję chemiczną miesza się w odpowiednim urządzeniu mieszającym. Następnie glebę przekłada się do doniczek i natychmiast wysiewa się nasiona.
16. Jeżeli zamiast gleby stosuje się podłoże sztuczne, substancje chemiczne, które są rozpuszczalne w wodzie, można rozpuścić w substancji biogennej tuż przed rozpoczęciem badania. Substancje chemiczne, które nie są rozpuszczalne w wodzie, ale które można zawiesić w wodzie za pomocą nośnika rozpuszczalnikowego, należy dodać wraz z nośnikiem do substancji biogennej. Nierozpuszczalne w wodzie substancje chemiczne, dla których nie jest dostępny nietoksyczny, rozpuszczalny w wodzie nośnik, należy rozpuścić w odpowiednim lotnym rozpuszczalniku. Otrzymany roztwór miesza się z piaskiem lub kulkami szklanymi, umieszcza w próżniowej wyparce rotacyjnej i odparowuje, pozostawiając jednolitą warstwę substancji chemicznej na piasku lub kulkach. Przed wypełnieniem doniczek zważoną porcję kulek należy poddać ekstrakcji w tym samym rozpuszczalniku organicznym i oznaczyć substancję chemiczną.

Zastosowanie powierzchniowe

17. W przypadku środków ochrony roślin badaną substancję chemiczną często aplikuje się poprzez zroszenie powierzchni gleby roztworem do badań. Cały sprzęt wykorzystany do przeprowadzenia badań, w tym sprzęt wykorzystany do przygotowania i podania badanej substancji chemicznej, powinien charakteryzować się taką konstrukcją i pojemnością, aby można było przeprowadzić badania z udziałem tego sprzętu w sposób precyzyjny oraz aby otrzymane pokrycie było odtwarzalne. Pokrycie powinno być jednolite na wszystkich powierzchniach gleby. Należy dołożyć starań, aby uniknąć możliwej adsorpcji substancji chemicznych przez sprzęt lub zaiscienia reakcji między substancjami a sprzętem (np. rury z tworzywa sztucznego i lipofilowe substancje chemiczne czy części stalowe i pierwiastki). Badaną substancję chemiczną rozpryskuje się na powierzchnię gleby, symulując typową aplikację za pomocą opryskiwacza. Zasadniczo objętości użyte do opryskiwania powinny być zgodne z normalną praktyką rolniczą i zwykle stosowanymi objętościami (należy uwzględnić w sprawozdaniu ilość wody itp.). Należy dobrać rodzaj dyszy, aby zapewnić jednolite pokrycie powierzchni gleby. W przypadku gdy stosowane są rozpuszczalniki i nośniki, należy utworzyć drugą grupę kontrolną roślin otrzymującą wyłącznie rozpuszczalnik/nośnik. Jest to konieczne w przypadku środków ochrony roślin badanych w formie preparatów.

Weryfikacja stężenia/poziomu badanej substancji chemicznej

18. Stosowane stężenia/poziomy muszą zostać potwierdzone odpowiednią weryfikacją analityczną. W przypadku rozpuszczalnych substancji chemicznych weryfikację wszystkich badanych stężeń/poziomów można potwierdzić za pomocą analizy najwyższego stężenia roztworu użytego do badań wraz z dokumentacją na temat późniejszego rozcieńczenia i wykorzystania skalibrowanego sprzętu do podawania substancji (np. skalibrowanych naczyń szklanych do analizy, kalibracji urządzeń do opryskiwania). W przypadku nierozpuszczalnych substancji chemicznych weryfikacja związku musi obejmować wagę badanej substancji chemicznej dodanej do gleby. Jeżeli wymagane jest wykazanie jednorodności, konieczna może być analiza gleby.

PROCEDURA

Projekt badania

19. Do doniczek wysiewa się nasiona tego samego gatunku. Liczba wysianych nasion na doniczkę będzie zależała od gatunku, wielkości doniczki i czasu trwania badania. Liczba roślin na doniczkę powinna zapewniać odpowiednie warunki wzrostu oraz uniemożliwiać nadmierne zagęszczenie roślin w doniczce przez cały czas trwania badania. Maksymalna gęstość wysiewu wynosi około 3–10 nasion na 100 cm² w zależności od wielkości nasion. Przykładowo zaleca się od jednego do dwóch nasion kukurydzy, soi, pomidora, ogórka lub buraka cukrowego na pojemnik o długości 15 cm; trzy nasiona rzepaku lub grochu na pojemnik o długości 15 cm; oraz 5–10 nasion cebuli, pszenicy albo innych małych nasion na pojemnik o długości 15 cm. Liczba nasion i doniczek z kontrpróbą (kontrpróbę definiuje się jako doniczkę, dlatego też rośliny w tej samej doniczce nie stanowią kontrpróby) powinna być odpowiednia dla optymalnej analizy statystycznej (21). Należy zauważyć, że zmienność będzie większa dla tych badanych gatunków, w przypadku których wysiewa się mniejszą liczbę dużych nasion na doniczkę (kontrpróba), niż dla tych, w przypadku których możliwe jest użycie większej liczby małych nasion na doniczkę. Zmienność tę można zminimalizować, wysiewając jednakową liczbę nasion do każdej doniczki.
20. Stosuje się grupy kontrolne w celu upewnienia się, że obserwowany wpływ jest związany wyłącznie z narażeniem na badaną substancję chemiczną lub można go przypisać wyłącznie takiemu narażeniu. Odpowiednia grupa kontrolna powinna być identyczna pod każdym względem z grupą badaną z wyjątkiem narażenia na badaną substancję chemiczną. W ramach danego badania wszystkie rośliny wykorzystane do badań łącznie z próbą kontrolną powinny pochodzić z tego samego źródła. Aby zapobiec błędowi systematycznemu, wymagane jest losowe przydzielanie doniczek do grupy badanej i kontrolnej.
21. Należy unikać stosowania nasion zaprawionych insektycydem lub fungicydem. Niektóre organy regulacyjne dopuszczają jednak stosowanie określonych fungicydów o działaniu powierzchniowym, tzw. fungicydów kontaktowych (takich jak kaptan, tiuram) (22). Jeżeli istnieje obawa dotycząca patogenów przenoszonych przez nasiona, można na krótko zanurzyć nasiona w słabym 5-procentowym roztworze podchlorynu, a następnie opłukać je obficie pod bieżącą wodą i osuszyć. Zapobiegawcze podawanie innych środków ochrony roślin jest niedozwolone.

Warunki badania

22. Warunki badania powinny być zbliżone do warunków koniecznych dla normalnego wzrostu badanych gatunków i odmian (przykładowe warunki badania zawiera dodatek 4). Wschodzące rośliny należy utrzymywać zgodnie z dobrą praktyką ogrodniczą w komorach, fitotronach lub szklarniach o kontrolowanym środowisku. W przypadku korzystania z systemów wspomagających wzrost takie praktyki zwykle obejmują kontrolowanie i odpowiednio częste (np. codzienne) rejestrowanie temperatury, wilgotności, stężenia dwutlenku węgla, światła (natężenia, długości fali, promieniowania fotosyntetycznie czynnego) oraz okresu oświetlenia, sposobów nawadniania itp., aby zagwarantować prawidłowy wzrost roślin ustalony na podstawie porównania z roślinami wybranego gatunku z próby kontrolnej. Temperaturę w szklarni należy kontrolować za pomocą systemów wentylacji, ogrzewania lub chłodzenia. Następujące warunki są zasadniczo zalecane w przypadku badań prowadzonych w szklarniach:

- temperatura: 22 °C ± 10 °C;
- wilgotność: 70 % ± 25 %;
- fotoperiod: co najmniej 16 godzin światła;
- natężenie światła: 350 ± 50 mE/m²/s; dodatkowe oświetlenie może być konieczne, jeżeli natężenie spada poniżej 200 mE/m²/s, długość fali 400–700 nm, z wyjątkiem niektórych gatunków, które mają mniejsze wymagania w zakresie światła.

Warunki otoczenia należy monitorować i odnotowywać w sprawozdaniach przez cały czas trwania badania. Rośliny należy uprawiać w nieporowatych doniczkach z tworzywa sztucznego lub doniczkach szklanych z podstawką lub spodkiem pod doniczką. Okresowo można zmieniać ustawienie doniczek, aby zminimalizować różnice we wzroście roślin (ze względu na różnice w warunkach badania w obrębie systemów wspomagających wzrost). Doniczki muszą być wystarczająco duże, aby umożliwiać normalny wzrost.

23. W razie potrzeby można uzupełniać składniki odżywcze w glebie w celu utrzymania odpowiedniego wigoru. Zapotrzebowanie na dodatkowe składniki odżywcze i częstotliwość ich podawania można ocenić na podstawie obserwacji roślin z grupy kontrolnej. Zaleca się nawadnianie pojemników badawczych od strony dna (np. za pomocą sznurów z włókna szklanego). Początkowo można jednak stosować nawadnianie od góry w celu stymulowania kiełkowania nasion; w przypadku aplikacji na powierzchnię gleby taki sposób nawadniania ułatwia wniknięcie substancji chemicznej do gleby.

24. Konkretny warunki wzrostu powinny być odpowiednie dla badanego gatunku i badanej substancji chemicznej. Rośliny w grupie kontrolnej i grupie badanej muszą być utrzymywane w identycznych warunkach otoczenia, należy jednak podjąć stosowne działania, aby zapobiec narażeniu krzyżowemu (np. na lotne substancje chemiczne) pomiędzy różnymi zabiegami oraz narażeniu grup kontrolnych na badaną substancję chemiczną.

Badanie przy jednym stężeniu/poziomie

25. Aby ustalić odpowiednie stężenie/poziom substancji chemicznej do celów przeprowadzenia badania przy jednym stężeniu lub poziomie (prowokacyjnym/granicznym), należy uwzględnić szereg czynników. W przypadku substancji chemicznych ogólnego zastosowania obejmują one właściwości fizyczne/chemiczne substancji chemicznej. W przypadku środków ochrony roślin należy wziąć pod uwagę właściwości fizyczne/chemiczne i schemat stosowania badanej substancji chemicznej, jej maksymalne stężenie lub poziom stosowania, liczbę zastosowań na sezon lub trwałość badanej substancji chemicznej. Aby ustalić, czy substancja chemiczna ogólnego zastosowania posiada właściwości fitotoksyczne, wskazane może być wykonanie badania przy maksymalnym poziomie 1 000 mg/kg suchej gleby.

Badanie ustalające zakres stężeń

26. W razie potrzeby można wykonać badanie ustalające zakres, aby zapewnić wytyczne dotyczące stężeń/poziomów, które należy zbadać w ostatecznym badaniu dawka-odpowiedź. Na potrzeby badania ustalającego zakres badane stężenia/poziomy powinny znacznie różnić się od siebie (np. 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg suchej gleby). W przypadku środków ochrony roślin stężenia/poziomy powinny opierać się na zalecanych lub maksymalnych stężeniach lub poziomach stosowania, np. 1/100, 1/10, 1/1 zalecanego lub maksymalnego stężenia lub poziomu stosowania.

Badania przy wielu stężeniach/poziomach

27. Celem badania przy wielu stężeniach/poziomach jest określenie zależności dawka-odpowiedź oraz ustalenie wartości EC_x lub ER_x w odniesieniu do wschodów, biomasy lub zmian wizualnych w porównaniu z próbami kontrolnymi nienarażonymi na działanie substancji, zgodnie z wymaganiami organów regulacyjnych.
28. Liczba i zróżnicowanie stężeń lub poziomów powinny być wystarczające do uzyskania wiarygodnej zależności dawka-odpowiedź i równania regresji oraz otrzymania oszacowania EC_x lub ER_x . Wybrane stężenia/poziomy powinny obejmować wartości EC_x lub ER_x , które mają zostać ustalone. Na przykład jeżeli wymagana jest wartość EC_{50} , wskazane byłoby wykonanie badania przy poziomach, które dają skutek rzędu 20–80 %. Aby to uzyskać, zalecana liczba badanych stężeń/poziomów wynosi co najmniej pięć stężeń/poziomów uporządkowanych w szereg geometryczny plus jedna grupa kontrolna nieobjęta działaniem substancji, przy czym każde kolejne stężenie nie powinno być większe niż trzykrotność poprzedniego. Dla każdej grupy badanej i kontrolnej liczba kontrprób powinna wynosić co najmniej cztery, a całkowita liczba nasion powinna wynosić co najmniej 20. W celu zwiększenia mocy statystycznej badania potrzebna może być większa liczba kontrprób roślin o wolniejszym tempie kiełkowania lub zmiennych schematach wzrostu. W przypadku zastosowania większej liczby badanych stężeń/poziomów można zmniejszyć liczbę kontrprób. Jeżeli wymagane jest oszacowanie NOEC, konieczne może być zastosowanie większej liczby kontrprób w celu uzyskania pożądanej mocy statystycznej (23).

Obserwacje

29. W okresie obserwacji, tj. po upływie 14–21 dni po wejściu 50 % roślin z grupy kontrolnej (również z grup kontrolnych z rozpuszczalnikami, jeżeli są dostępne), rośliny są często obserwowane (co najmniej raz w tygodniu, a w miarę możliwości codziennie) pod kątem wschodów i widocznych oznak fitotoksyczności i śmiertelności. Po zakończeniu badania należy odnotować pomiar procentowych wschodów i biomasy ocalałych roślin, jak również widoczny negatywny wpływ na różne części rośliny. Wspomniane negatywne skutki obejmują anomalie w wyglądzie siewek, zahamowany wzrost, chlorozę, zmianę barwy, śmiertelność i wpływ na rozwój roślin. Biomasa końcową można zmierzyć z wykorzystaniem końcowej średniej suchej masy kiełków ocalałych roślin, ścinając kiełki przy powierzchni gleby i susząc je do otrzymania stałej masy w temperaturze 60 °C. Ewentualnie biomasa końcowa można zmierzyć z wykorzystaniem mokrej masy kiełków. Kolejnym parametrem docelowym może być wysokość kiełków, jeżeli jest to wymagane przez organy regulacyjne. Do oceny obserwowalnych efektów toksycznych należy zastosować jednolity system oceny punktowej widocznych uszkodzeń. Przykłady przeprowadzania jakościowej i ilościowej oceny wizualnej i przyznawania punktów można znaleźć w pozycjach (23) (24).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Analiza statystyczna*Badanie przy jednym stężeniu/poziomie*

30. Analizę danych dotyczących każdego gatunku roślin należy przeprowadzić z wykorzystaniem odpowiedniej metody statystycznej (21). Należy odnotować w sprawozdaniu poziom skutku przy badanym stężeniu/poziomie albo brak określonego skutku przy badanym stężeniu/poziomie (np. przy stężeniu lub poziomie y zaobserwowano x % skutku).

Badanie przy wielu stężeniach/poziomach

31. Zależność dawka-odpowiedź określa się na podstawie równania regresji. Zastosować można różne modele, na przykład w celu oszacowania wartości EC_x lub ER_x (np. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) i ich granic ufności w postaci danych binarnych w odniesieniu do wschodów odpowiednie mogą być np. metody analizy logitowej, probitowej, analizy Weibulla, metoda Spearmana-Kärbera czy uproszczona metoda Spearmana-Kärbera. W odniesieniu do wzrostu siewek (wagi i wysokości) jako ciągłych punktów końcowych, EC_x lub ER_x i ich granice ufności można oszacować, stosując odpowiednią analizę regresji (np. analizę regresji nieliniowej Bruce'a-Versteega (25)). W miarę możliwości R^2 powinno wynosić co najmniej 0,7 w przypadku najwrażliwszych gatunków, a zastosowane badane stężenia/poziomy powinny obejmować 20–80 % skutków. Jeżeli konieczne jest oszacowanie NOEC, zaleca się zastosowanie testów statystycznych o dużej mocy, które należy wybrać na podstawie rozkładu danych (21) (26).

Sprawozdanie z badania

32. Sprawozdanie z badania powinno zawierać wyniki badań, jak również szczegółowy opis warunków badania, dokładne omówienie wyników, analizę danych oraz wnioski wyciągnięte z analizy. Należy przedstawić tabelaryczne zestawienie oraz streszczenie wyników. Sprawozdanie musi zawierać następujące informacje.

Badana substancja chemiczna:

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, istotne właściwości badanej substancji chemicznej (np. logarytm P_{ow} , rozpuszczalność w wodzie, prężność pary oraz informacje o losach środowiskowych i zachowaniu w środowisku, jeżeli są dostępne);
- szczegółowe dane dotyczące sporządzenia roztworu do badań oraz weryfikacji badanych stężeń, jak określono w pkt 18.

Badany gatunek:

- szczegółowe informacje dotyczące organizmu użytego do badania: gatunek/odmiana, rodzina roślin, nazwa systematyczna i zwyczajowa, źródło oraz jak najbardziej szczegółowa historia nasion (np. nazwa dostawcy, zdolność kiełkowania, klasa wielkości nasion, numer partii lub serii, rok pochodzenia nasion lub sezonu wegetacyjnego podczas którego je zebrano, data oceny kiełkowania), żywotność itd.;
- liczba badanych gatunków jedno- i dwuliściennych;
- uzasadnienie wyboru gatunków;
- opis przechowywania, zaprawiania i konserwacji nasion.

Warunki badania:

- aparatura badawcza (np. komora wzrostu, fitotron i szklarnia);
- opis układu badawczego (np. wymiary doniczek, materiał, z którego wykonano doniczki, i ilości gleby);
- charakterystyka gleby (tekstura lub rodzaj gleby: rozmieszczenie cząstek gleby i klasyfikacja, właściwości fizykochemiczne w tym % materii organicznej, % węgla organicznego i pH);
- przygotowanie gleby/podłoża przed badaniem (np. gleba, sztuczna gleba, piasek i inne);
- opis pożywki, jeżeli została zastosowana;

- zastosowanie badanej substancji chemicznej: opis metody zastosowania, opis sprzętu, poziomy narażenia i objętości, w tym weryfikacja chemiczna, opis metody kalibracji oraz opis warunków otoczenia panujących podczas zastosowania;
- natężenie światła (np. PAR, promieniowanie fotosyntetycznie czynne), fotoperiod, maksymalne/minimalne temperatury, harmonogram i sposób nawadniania, nawożenie;
- liczba nasion na doniczkę, liczba roślin na dawkę, liczba kontrprób (doniczek) na poziom narażenia;
- rodzaj i liczba prób kontrolnych (ujemne lub dodatnie próby kontrolne, próba kontrolna z rozpuszczalnikiem, jeżeli została zastosowana);
- czas trwania badania.

Wyniki:

- zestawienie wszystkich punktów końcowych w przypadku każdej kontrpróby, badanego stężenia/poziomu i gatunku;
- liczba i procent wschodów w porównaniu z próbami kontrolnymi;
- pomiary biomasy (suchej lub mokrej masy kielków) roślin jako odsetek prób kontrolnych;
- wysokość kielków roślin jako odsetek prób kontrolnych, jeżeli została zmierzona;
- procent widocznych uszkodzeń oraz jakościowy i ilościowy opis widocznych uszkodzeń (chloroza, martwica, więdnienie, deformacja liści i łodygi, jak również ewentualny brak skutków) spowodowanych badaną substancją chemiczną w porównaniu z roślinami z próby kontrolnej;
- opis skali stosowanej do oceny widocznych uszkodzeń, jeżeli przeprowadzono ocenę wizualną;
- w przypadku badań obejmujących jeden poziom w sprawozdaniu należy odnotować odsetek uszkodzeń;
- wartości EC_x lub ER_x (np. EC_{50} , ER_{50} , EC_{25} , ER_{25}) i powiązane granice ufności. Jeżeli zastosowana została analiza regresji, należy przedstawić błąd standardowy w odniesieniu do równania regresji oraz błąd standardowy w przypadku poszczególnych oszacowań parametru (np. nachylenie, punkt przecięcia);
- wartości NOEC (oraz LOEC), jeżeli zostały obliczone;
- opis procedur statystycznych oraz wykorzystane założenia;
- graficzne przedstawienie tych danych oraz zależności dawka-odpowiedź w przypadku badanych gatunków.

Odchylenia od procedur opisanych w niniejszej metodzie badawczej oraz wszelkie nietypowe zdarzenia, jakie miały miejsce podczas badania.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Schrader G., Metge K. i Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. *Applied Soil Ecology*, 7, 189–193.
- (2) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna. (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) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna. (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) Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
- (5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, część 158.540. Poddział J, części 122-1 i 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. i Keddy C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Seria raportów technicznych nr 145. Canadian Wildlife Service (siedziba główna), Environment Canada, Hull, Québec, Kanada.
- (9) Forster R., Heimbach U., Kula C. i 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. Nr 48.
- (10) Hale B., Hall J.C., Solomon K. i Stephenson G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centrum Toksykologii, Uniwersytet w Guelph, Ontario, Kanada.
- (11) Soil Texture Classification (systemy US i FAO): Weed Science, 33, suplement 1 (1985) oraz Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (12) Audus L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. W: Audus, L.J. (red.) *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, Londyn, Nowy York, Academic Press, NY, rozdział 5, s. 163–206.
- (13) Beall M.L., Jr. i 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. i Chesters G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247–250.
- (15) Urząd ds. Żywności i Leków (FDA) Stanów Zjednoczonych. (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 s., FDA, Waszyngton D.C.
- (16) McKelvey R.A., Wright J.P., Honegger J.L. i Warren L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science tom 58: 1161–1174
- (17) Boutin C., Elmegaard N. i Kjaer C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology, tom 13(4): 349–369.
- (18) Boutin C. i Rogers C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology, tom 9(4): 255–271.
- (19) Boutin C. i 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) 155–271. Boutin C., Lee H.-B., Peart T.E., Batchelor S.P. i Maguire R.J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532–2541.
- (21) OECD (2006). Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.
- (22) Hatzios K.K. i 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. i G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. *Weed Science* 25: 386–389.
- (24) Frans R.E. i Talbert R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. W: B. Truelove (red.) *Research Methods in Weed Science*, wydanie 2. Southern weed Science Society, Auburn, 15–23.
- (25) Bruce R.D. i Versteeg D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1 485–1 492.
- (26) Rozdział C.33 niniejszego załącznika: Badanie rozrodczości dżdżownic (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Substancja czynna (lub substancja aktywna) jest to materiał służący do wywołania określonego skutku biologicznego (np. zwalczania owadów, zwalczania chorób roślin, zwalczania chwastów na obszarze, na którym przeprowadza się zabieg), znany również jako czysty technicznie składnik aktywny.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Środki ochrony roślin lub pestycydy są to materiały posiadające określoną biologiczną aktywność, wykorzystywane specjalnie w celu ochrony roślin przed szkodnikami (np. grzybicami, owadami i konkurencyjnymi roślinami).

EC_x, stężenie efektywne x %, lub ER_x, dawka powodująca zmianę x % oznacza stężenie lub dawkę, których wynikiem jest niepożądana zmiana lub modyfikacja o x % w punkcie końcowym badania zmierzona w odniesieniu do próby kontrolnej (np. zmniejszenie o 25 % lub 50 % w zakresie wschodów siewek, wagi kielków, ostatecznej liczby roślin lub zwiększenie liczby widocznych uszkodzeń stanowiłyby odpowiednio EC₂₅/ER₂₅ lub EC₅₀/ER₅₀).

Wschód oznacza wykształcenie się koleoptylu lub liścienia nad powierzchnią gleby.

Preparat jest to dostępna w handlu użytkowa postać produktu zawierająca substancję czynną (składnik aktywny), znana również jako gotowy preparat ⁽¹⁾ lub typowy produkt końcowego przeznaczenia.

LOEC (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany) oznacza najniższe stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym zaobserwowano szkodliwe zmiany. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające LOEC ma statystycznie istotny skutek ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia przy porównaniu z próbą kontrolną i jest wyższe niż wartość NOEC.

Rośliny niebędące przedmiotem badania są to rośliny, które znajdują się poza docelowym obszarem porośniętym przez rośliny. W przypadku środków ochrony roślin dotyczy to zazwyczaj roślin znajdujących się poza obszarem, na którym przeprowadza się zabieg.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym nie zaobserwowano żadnych szkodliwych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego skutku ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia, jeżeli porówna się je z próbą kontrolną.

Fitotoksyczność to negatywne odchylenia (oceniane na podstawie pomiarów i oceny wizualnej) od normalnego wzorca wyglądu i wzrostu roślin w reakcji na podanie danej substancji chemicznej.

Kontrpróba oznacza jednostkę doświadczalną, która odpowiada grupie kontrolnej lub grupie badanej. W niniejszych badaniach doniczka jest zdefiniowana jako kontrpróba.

Ocena wizualna oznacza oszacowanie widocznych uszkodzeń na podstawie obserwacji stanu roślin, wigoru, deformacji, chlorozy, martwicy i ogólnego wyglądu w porównaniu z próbą kontrolną.

Badana substancja chemiczna jest to dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

⁽¹⁾ Gotowy preparat: Gotowy preparat jest to użytkowa postać produktu zawierająca aktywną substancję chemiczną (składnik aktywny), dostępna w handlu.

Dodatek 2

Lista gatunków stosowanych w przeszłości w badaniach roślin

Rodzina	Gatunek	Nazwy zwyczajowe
DWULIŚCIENNE		
Selerowate (Apiaceae, Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Marchew
Astrowate (Asteraceae, Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Słonecznik
Astrowate (Asteraceae, Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Salata siewna
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Gorczyca jasna
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Kapusta chińska
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Rzepak
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Kapusta
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Rzepa
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Rzeżucha ogrodowa
Kapustowate (Brassicaceae, Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Rzodkiew zwyczajna
Komosowate (Chenopodiaceae)	<i>Beta vulgaris</i>	Burak cukrowy
Dyniowate (Cucurbitaceae)	<i>Cucumis sativus</i>	Ogórek
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	<i>Glycine max</i> (G. soja)	Soja
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Fasola mung
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fasola karłowa, fasola zwykła, fasola
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Groch
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Kozieradka pospolita
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Komonica zwyczajna
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Koniczyna czerwona
Bobowate (Fabaceae, Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Wyka
Lnowate (Linaceae)	<i>Linum usitatissimum</i>	Len
Rdestowate (Polygonaceae)	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Gryka zwyczajna
Psiankowate (Solanaceae)	<i>Solanum lycopersicon</i>	Pomidor

Rodzina	Gatunek	Nazwy zwyczajowe
JEDNOLIŚCIENNE		
Liliowate (Liliaceae, Amarylladaceae)	<i>Allium cepa</i>	Cebula
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Owies zwyczajny
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Jęczmień
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Życica trwała
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Ryż
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Żyto
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Ziarno sorgo, sorgo cukrowe
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Pszenica
Wiechlinowate (Poaceae, Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Kukurydza zwyczajna

Lista potencjalnych gatunków nieuprawnych

OECD Potencjalne gatunki, które wykorzystać można w badaniu toksyczności wobec roślin

Uwaga: Niniejsza tabela zawiera informacje dotyczące 52 gatunków nieuprawnych (w nawiasach podane zostały odniesienia dla każdej pozycji). Przedstawione poziomy wschodów zaczerpnięto z opublikowanej literatury i stanowią one jedynie ogólne wytyczne. Poszczególne doświadczenia mogą różnić się w zależności od źródła nasion i innych czynników.

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ⁽¹⁾ i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ⁽²⁾	Głębokość wysiewu (mm) ⁽³⁾	Okres do wykielkowania (dni) ⁽⁴⁾	Specjalne zabiegi ⁽⁵⁾	Badanie toksyczności ⁽⁶⁾	Dostawcy nasion ⁽⁷⁾	Inne odniesienia ⁽⁸⁾
SELEROWATE (APIACEAE) <i>Torilis japonica</i> (kłobuczka pospolita)	A, B obszary naruszone, żywopłoty, pastwiska (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	$\dot{S} = C$ (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	stratyfikacja chłodna (7, 14, 18, 19) konieczne może być dojrzewanie (19) brak światła hamuje kiełkowanie (1, 19) brak specjalnych zabiegów (5)	PO (5)		
ASTROWATE (ASTERACEAE) <i>Bellis perennis</i> (stokrotka pospolita)	P obszary trawiaste, grunty orne, darń (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	$\dot{S} = C$ (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (18, 19) brak specjalnych zabiegów (4, 14)	PO (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (chaber bławatek)	A pola, pobocza dróg, otwarte siedliska (16)	4,1–4,9 (4, 14)	$\dot{S} = C$ (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	brak specjalnych zabiegów (2, 4)	PO (2,4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (chaber ciemny)	P pola, pobocza dróg, otwarte siedliska (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	$\dot{S} = C$ (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	konieczne może być dojrzewanie (18, 19) brak światła hamuje kiełkowanie (19) brak specjalnych zabiegów (5, 14, 26)	PO (5, 22, 26)	A	
<i>Inula helenium</i> (oman wielki)	P wilgotne, obszary naruszone (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		brak specjalnych zabiegów (4)	PO (4)	A, F	

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ⁽¹⁾ i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ⁽²⁾	Głębokość wysiewu (mm) ⁽³⁾	Okres do wykiełkowania (dni) ⁽⁴⁾	Specjalne zabiegi ⁽⁵⁾	Badanie toksyczności ⁽⁶⁾	Dostawcy nasion ⁽⁷⁾	Inne odniesienia ⁽⁸⁾
<i>Leontodon hispidus</i> (mlecz)	P pola, pobocza dróg, obszary naruszone (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	Ś = C (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (17, 18, 19) brak specjalnych zabiegów (5, 23)	PO (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (rudbekia owłosiona)	B, P obszary naruszone (16)	0,3 (4), 14	Ś = C (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	brak specjalnych zabiegów (4, 14, 33)	PO (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> (nawłoc kanadyjska)	P pastwiska, otwarte obszary (16)	0,06–0,08 (4, 14)	Ś = C (11)	0 (4)	14-21 (11)	wymieszać z równą częścią piasku i namaczać w 500 ppm kwasu giberelinowego przez 24 godz. (11) brak specjalnych zabiegów (4)	PO (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i> (rzepień)	A pola, otwarte siedliska (16)	25–61 (14, 29)		0(1) 5(29)		brak światła może hamować kiełkowanie (1) namaczać w ciepłej wodzie przez 12 godz. (29)	PRZED i PO (31)	A	
<i>Xanthium spinosum</i> (rzepień kolczasty)	A otwarte siedliska (16)	200 (14)	Ś = C (14) Ś > C (6)	10 (6)		wertykulacja (14) brak specjalnych zabiegów (6)	PRZED i PO (6)	A	
<i>Xanthium strumarium</i> (rzepień pospolity)	A pola, otwarte siedliska (16)	67,4 (14)	Ś = C (14)	10-20 (6, 21)		brak specjalnych zabiegów (6, 14, 21)	PRZED i PO (6, 21, 28, 31)	A	

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ⁽¹⁾ i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ⁽²⁾	Głębokość wysiewu (mm) ⁽³⁾	Okres do wykiełkowania (dni) ⁽⁴⁾	Specjalne zabiegi ⁽⁵⁾	Badanie toksyczności ⁽⁶⁾	Dostawcy nasion ⁽⁷⁾	Inne odniesienia ⁽⁸⁾
KAPUSTOWATE (BRASSICACEAE) <i>Cardamine pratensis</i> (rzeżucha łąkowa)	P pola, pobocza dróg, darń (16, 19)	0,6 (14), 19	Ś = C (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (18, 19) brak specjalnych zabiegów (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	
GOŹDZIKOWATE (CARYOPHYLLACEAE) <i>Lychnis flos-cuculi</i> (firletka poszarpana)	P (16)	0,21 (14)	Ś = C (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	konieczne może być dojrzewanie (18) brak specjalnych zabiegów (5, 14, 15, 22–26)	PO (5, 15, 22–26)	F	
KOMOSOWATE (CHENOPODIACEAE) <i>Chenopodium album</i> (komosa biała)	A miedze, obszary naruszone (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	Ś = C (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	poddanie zabiegom różni się w zależności od koloru nasiona (19) suche przechowywanie w okresie spoczynku (19) brak światła hamuje kiełkowanie (1, 18, 19) stratyfikacja chłodna (18) brak specjalnych zabiegów (14, 34)	PRZED i PO (28, 31, 34)	A	32
KLUZJOWATE (CLUSIACEAE) <i>Hypericum perforatum</i> (dziurawiec zwyczajny)	P pola, grunty orne, otwarte siedliska (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	Ś = C (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (1, 18, 19) brak specjalnych zabiegów (5, 14, 15, 25, 27)	PO (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
POWOJOWATE (CONVOLVULACEAE) <i>Ipomoea hederacea</i> (wilec bluszczowy)	A pobocza dróg, otwarte siedliska, pola uprawne (16)	28,2 (14)	Ś > C (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (6, 21)	PRZED i PO (6, 12, 21, 28)	A	
TURZYCOWATE (CYPERACEAE) <i>Cyperus rotundus</i> (turzyca)	P grunty orne, pastwiska, pobocza dróg (16, 30)	0,2 (14)	Ś = C (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	brak światła hamuje kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (6, 10, 14)	PRZED i PO (6, 28, 31)	B	7

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ⁽¹⁾ i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ⁽²⁾	Głębokość wysiewu (mm) ⁽³⁾	Okres do wykiełkowania (dni) ⁽⁴⁾	Specjalne zabiegi ⁽⁵⁾	Badanie toksyczności ⁽⁶⁾	Dostawcy nasion ⁽⁷⁾	Inne odniesienia ⁽⁸⁾
BOBOWATE (FABACEAE) <i>Lotus corniculatus</i> (komonica zwyczajna)	P obszary trawiaste, pobocza dróg, otwarte siedliska (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	Ś = C (14)		1 (50 %) (19)	wertykulacja (14, 19) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (18, 19) brak specjalnych zabiegów (23, 25)	PO (5, 23, 25)	A, D, E, F	
<i>Senna obtusifolia</i> (strączyniec tępoliściowy)	A wilgotne lasy (16)	23-28 (9)	Ś = C (14) Ś > C (9)	10-20 (6,9)		namaczać nasiona w wodzie przez 24 godz. (9) wertykulacja (14) żywotność nasion różni się w zależności od koloru (1) brak specjalnych zabiegów (6)	PO (6,9)	A	
<i>Sesbania exaltata</i> (konopie)	A gleba aluwialna (16)	11–13 (9, 14)	Ś > C (9)	10–20 (9, 21)		namaczać nasiona w wodzie przez 24 godz. (9) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (21)	PRZED i PO (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> (koniczyna czerwona)	P pola, pobocza dróg, grunty orne (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	Ś = C (14)		1 (50 %) (19)	wertykulacja (14, 18) konieczne może być dojrzewanie (19) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1, 19) brak specjalnych zabiegów (5)	PO (5)	A, E, F	
LAM IAC E AE <i>Leonurus cardiaca</i> (serdecznik pospolity)	P otwarte obszary (16)	0,75–1,0 (4, 14)	Ś = C (14)	0 (4)		brak specjalnych zabiegów (4, 14)	PO (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (mięta zielona)	P wilgotne obszary (16)	2,21 (4)		0 (4)		brak specjalnych zabiegów (4)	PO (4)	F	

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ⁽¹⁾ i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ⁽²⁾	Głębokość wysiewu (mm) ⁽³⁾	Okres do wykiełkowania (dni) ⁽⁴⁾	Specjalne zabiegi ⁽⁵⁾	Badanie toksyczności ⁽⁶⁾	Dostawcy nasion ⁽⁷⁾	Inne odniesienia ⁽⁸⁾
<i>Nepeta cataria</i> (kocimiętka właściwa)	P obszary naruszone (16)	0,54 (4, 14)	Ś = C (14)	0 (4)		brak specjalnych zabiegów (2, 4, 14)	PO (2,4)	F	
<i>Prunella vulgaris</i> (głowienka pospolita)	P grunty orne, obszary trawiaste, obszary naruszone (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	Ś = C (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	Ś = C brak światła hamuje kiełkowanie (18, 19) większe kiełkowanie w przypadku większych nasion (1) brak specjalnych zabiegów (4, 14, 22)	PO (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (bukwica zwyczajna)	P obszary trawiaste, miedze (19)	14–18 (14, 19)	Ś = C (14)		7 (50 %) (19)	brak specjalnych zabiegów (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	
ŚLAZOWATE (MALVACEAE) <i>Abutilón theophrasti</i> (zaślaz pospolity)	A pola, otwarte siedliska (16)	8,8 (14)	Ś = C (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	wertykulacja (14) brak specjalnych zabiegów (5, 10, 21)	PRZED i PO (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> (ślazowiec ciernisty)	A pola, pobocza dróg (16)	3,8 (14)	Ś = C (14)	10–20 (6, 21)		wertykulacja (14) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (6, 21)	PRZED i PO (6, 21, 28, 31)	A, F	
MAKOWATE (PAPAVACEAE) <i>Papaver rhoeas</i> (mak polny)	A pola, pola uprawne, obszary naruszone (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	Ś = C (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratyfikacja chłodna i wertykulacja (1, 19, 32) brak specjalnych zabiegów (4, 14, 29)	PO (4)	A, D, E, F, G	

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ⁽¹⁾ i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ⁽²⁾	Głębokość wysiewu (mm) ⁽³⁾	Okres do wykiełkowania (dni) ⁽⁴⁾	Specjalne zabiegi ⁽⁵⁾	Badanie toksyczności ⁽⁶⁾	Dostawcy nasion ⁽⁷⁾	Inne odniesienia ⁽⁸⁾
WIECHLINOWATE (POACEAE) <i>Agrostis tenuis</i> (mietlica pospolita)	trawniki, pastwiska (16)	0,07 (14)	Ś > C (10)	20 (10)	10 (62 %) (10)	brak światła hamuje kiełkowanie (1, 17–19) brak specjalnych zabiegów (10)	PO (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (wyczyniec polny)	A pola, otwarte siedliska (16)	0,9–1,6 (29, 34)	Ś = C (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	wertykulacja (14) podanie działaniu 101 mg/L KNO ₃ (14) stratyfikacja ciepła (1) brak światła hamuje kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (34)	PRZED i PO (28, 34)	A	32
<i>Avena fatua</i> (owies głuchy)	A obszary uprawne, otwarte siedliska (16)	7–37,5 (14, 30)	Ś = C (14) Ś > C (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	wertykulacja (7, 32) brak światła hamuje kiełkowanie (1) stratyfikacja chłodna (1, 18) brak specjalnych zabiegów (6, 10, 14)	PRZED i PO (6, 10, 28, 31)	A	
<i>Bromus tectorum</i> (stokłosa dachowa)	A pola, pobocza dróg, grunty orne (16)	0,45–2,28 (14, 29)	Ś = C (14)	3 (29)		okres dojrzewania (1, 7, 32) kiełkowanie hamowane przez światło (1) brak specjalnych zabiegów (14)	PRZED i PO (28, 31)	A	
<i>Cynosurus cristatus</i> (grzebienica pospolita)	P pola, pobocza dróg, otwarte siedliska (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	Ś = C (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (19) brak specjalnych zabiegów (14, 29)	PO (5)	A	

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ⁽¹⁾ i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ⁽²⁾	Głębokość wysiewu (mm) ⁽³⁾	Okres do wykiełkowania (dni) ⁽⁴⁾	Specjalne zabiegi ⁽⁵⁾	Badanie toksyczności ⁽⁶⁾	Dostawcy nasion ⁽⁷⁾	Inne odniesienia ⁽⁸⁾
<i>Digitaria sanguinalis</i> (palusznik krwawy)	A pola, darń, otwarte siedliska (16)	0,52–0,6 (14, 30)	Ś = C (14)	10–20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	wertykulacja, stratyfikacja chłodna i dojrzwianie (1, 7, 14, 32) podać działaniu 101 mg/L KNO ₃ (14) brak światła hamuje kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (21)	PRZED i PO (18, 25, 31)	A	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (chwastnica jednostronna)	A (16)	1,5 (14)	Ś = C (14) Ś > C (3)	10–20 (7, 21)		wertykulacja (7, 32) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (3, 14, 21)	PRZED i PO (3, 21, 28, 31)	A	
<i>Elymus canadensis</i> (wydmuchrzyca kanadyjska)	P obszary nadbrzeżne, obszary naruszone (16)	4–5 (14, 30)	Ś = C (11)	1 (11)	14–28 (11)	brak specjalnych zabiegów (2, 11)	PO (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (kostrzewa łąkowa)	P pola, wilgotne obszary (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	Ś = C (14) Ś > C (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	brak specjalnych zabiegów (10, 19)	PO (10)	A	7
<i>Hordeum pusillum</i> (gatunek jęczmienia)	A pastwiska, pobocza dróg, otwarte siedliska (16)	3,28 (14)				stratyfikacja ciepła (1) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1)	PRZED (31)		7
<i>Phleum pratense</i> (Timothy)	P pastwiska, pola uprawne, obszary naruszone (16, 19)	0,45 (14), 19	Ś > C (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	brak światła hamuje kiełkowanie (19) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (17) brak specjalnych zabiegów (10, 14, 17, 19)	PO (10)	A, E	

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ⁽¹⁾ i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ⁽²⁾	Głębokość wysiewu (mm) ⁽³⁾	Okres do wykiełkowania (dni) ⁽⁴⁾	Specjalne zabiegi ⁽⁵⁾	Badanie toksyczności ⁽⁶⁾	Dostawcy nasion ⁽⁷⁾	Inne odniesienia ⁽⁸⁾
RDESTOWATE (POLYGONACEAE) <i>Polygonum convolvulus</i> (rdestówka powojowata)	A otwarte siedliska, pobocza dróg (16)	5–8 (4, 14, 29)	Ś = C (20)	0–2 (4, 29)		stratyfikacja chłodna przez 4–8 tygodni (1, 2, 4, 20, 29) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1)	PRZED i PO 1, 2, 20, 28, 31	A	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (rdest szczawiolistny)	A wilgotna gleba (16)	1,8–2,5 (14)	Ś > C (6)		5 (94 %) (18)	natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (1) brak światła hamuje kiełkowanie (18) stratyfikacja chłodna (1) brak specjalnych zabiegów (5)	PRZED i PO (6)	A, E	
<i>Polygonum pennsylvanicum</i> (rdest pensylwański)	A pola, otwarte siedliska (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		stratyfikacja chłodna przez 4 tygodnie w temperaturze 0–5 oC (1, 29) brak światła hamuje kiełkowanie (1)	PRZED (31)	A, E	
<i>Polygonum periscaria</i> (rdest plamisty)	A obszary naruszone, pola uprawne (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	Ś > C (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	wertykulacja, stratyfikacja chłodna, poddanie działaniu GA (14) stratyfikacja chłodna, dojrzewanie (17–19) brak światła hamuje kiełkowanie (19) brak specjalnych zabiegów (13)	PO (13)	A	32
<i>Rumex crispus</i> (szczaw kędzierzawy)	P grunty orne, pobocza dróg, otwarte obszary (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	Ś = C (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	brak światła hamuje kiełkowanie (18, 19) konieczne może być dojrzewanie (18) brak specjalnych zabiegów (4, 14, 33)	PO (4, 33)	A, E	32

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ⁽¹⁾ i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ⁽²⁾	Głębokość wysiewu (mm) ⁽³⁾	Okres do wykiełkowania (dni) ⁽⁴⁾	Specjalne zabiegi ⁽⁵⁾	Badanie toksyczności ⁽⁶⁾	Dostawcy nasion ⁽⁷⁾	Inne odniesienia ⁽⁸⁾
PIERWIOSNKOWATE (PRIMULACEAE) <i>Anagallis arvensis</i> (kurzyśląd polny)	A grunty orne, otwarte obszary, obszary naruszone (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	Ś = C (14)		1 (50 %) (19)	stratyfikacja chłodna, poddanie działaniu kwasu giberelinowego (1, 14, 18, 19, 32) światło jest do kiełkowania konieczne (1) brak specjalnych zabiegów (2, 4)	PO (2,4)	A, F	
PIERWIOSNKOWATE (RANUNCULACEAE) <i>Ranunculus acris</i> (jaskier ostry)	P grunty orne, pobocza dróg, otwarte obszary (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	Ś = C (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	brak specjalnych zabiegów (5, 14, 22, 24–26)	PO (5, 22, 24–26)		32
RÓŻOWATE (ROSA-CEAE) <i>Geum urbanum</i> (kuklik pospolity)	P żywopłoty, wilgotne obszary (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	Ś = C (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (18, 19) stratyfikacja ciepła (1) brak specjalnych zabiegów (5, 14, 22, 25, 26)	PO (5, 22, 25, 26)	A	
MARZANOWATE (RUBIACEAE) <i>Galium aparine</i> (przytulia czepna)	A grunty orne, wilgotne obszary, obszary naruszone (16, 19)	7–9 (14, 19)	Ś = C (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	stratyfikacja chłodna (1, 18, 19) natężenie promieniowania nie ma wpływu na kiełkowanie (18, 19) światło hamuje kiełkowanie (1) brak specjalnych zabiegów (6, 14)	PRZED i PO (6, 28)	A	32
<i>Galium mollugo</i> (przytulia pospolita)	P żywopłoty, otwarte obszary (8)	7 (29)	Ś = C (14)	2 (29)		brak specjalnych zabiegów (5, 14, 22, 24, 26, 29)	PO (5, 22, 24, 26)	A	
TRĘDOWNIKOWATE (SCROPHULARIACEAE) <i>Digitalis purpurea</i> (naparstnica purpurowa)	B, P żywopłoty, otwarte obszary (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	Ś = C (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (1, 17–19) brak specjalnych zabiegów (4, 22–26)	PO (4, 22–26)	D, G, F	

RODZINA Nazwa botaniczna gatunku (polska nazwa zwyczajowa)	Długość życia ⁽¹⁾ i siedlisko	Waga nasiona (mg)	Fotoperiod w okresie kiełkowania lub wzrostu ⁽²⁾	Głębokość wysiewu (mm) ⁽³⁾	Okres do wykiełkowania (dni) ⁽⁴⁾	Specjalne zabiegi ⁽⁵⁾	Badanie toksyczności ⁽⁶⁾	Dostawcy nasion ⁽⁷⁾	Inne odniesienia ⁽⁸⁾
<i>Veronica persica</i> (przetacznik perski)	A grunty orne, otwarte obszary, obszary naruszone (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	Ś = C (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	brak światła hamuje kiełkowanie (18, 19) stratyfikacja chłodna (18) brak specjalnych zabiegów (14)	PRZED i PO (28)	A	32

⁽¹⁾ A = rośliny jednoroczne, B = rośliny dwuletnie, P = rośliny wieloletnie.

⁽²⁾ Odniesienia 11, 14 i 33 wskazują na stosunek światła (Ś) do braku światła (C) konieczny do wywołania kiełkowania nasion. Odniesienia 3, 6, 9, 10, 13, 20 wskazują na warunki wzrostu w szklarniach.

⁽³⁾ 0 mm wskazuje, że nasiona wysiano na powierzchni gleby albo że nasiona potrzebują światła do kiełkowania.

⁽⁴⁾ Przedstawione liczby oznaczają liczbę dni do momentu wykiełkowania określonego odsetka nasion zgodnie z przedstawionymi odniesieniami np. 3 dni (50 %) kiełkowania (odniesienie 19).

⁽⁵⁾ Czas trwania dojrzewania lub stratyfikacji nie zawsze jest znany. Poza wymogami związanymi z utrzymywaniem chłodu warunki temperaturowe nie są sprecyzowane, ponieważ w przypadku badań w szklarni kontrolowanie temperatury jest ograniczone. Większość nasion wykiełkuje w warunkach normalnych zmian temperatury panujących w szklarniach.

⁽⁶⁾ Wskazuje, że gatunek został wykorzystany w badaniu toksyczności wobec roślin przed wejściem (PRZED) lub po wejściu (PO) obejmującym herbicydy.

⁽⁷⁾ Przedstawia przykładowych komercyjnych dostawców nasion.

⁽⁸⁾ Przedstawia dwie alternatywne pozycje literatury, do których się odwołało.

Przywołani dostawcy nasion

Identyfikator dostawcy	Informacje o dostawcy
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ WIELKA BRYTANIA +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 STANY ZJEDNOCZONE (727) 344 – 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla – Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 KANADA (519) 586–3 985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 STANY ZJEDNOCZONE (303) 431–7 333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 STANY ZJEDNOCZONE (800) 873 – 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB WIELKA BRYTANIA +44 1229 581137 www.chilternseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 KANADA (800) 274 – 7333 www.thompson-morgan.com

PRZYWOŁANE POZYCJE LITERATURY

- (1) Baskin, C.C. i 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. i 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): 2 532–2 541.
- (4) Boutin C., Elmegaard N. i 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. i 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. i Farmer D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. W: Plants for toxicity assessment: tom 2. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, i M. A. Lewis, (red.), Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów, Filadelfia. s. 197–208.

- (7) Buhler, D.D. i 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. i Warburg E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, wyd. 3. Cambridge University Press, Cambridge
- (9) Clay, P.A. i 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. i 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. s. 151 – 156.
- (11) Fiely M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Informacje własne. (www.ernstseed.com)
- (12) Fletcher J.S., Johnson F.L. i 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., Pfleege T.G., Ratsch H.C. i 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. i Dickie J.B. 2004. Seed Information Database (wersja 6.0, październik 2004 r.) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgekew.org.uk/data/sid)
- (15) Franzaring J., Kempenaar C. i 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. i Cronquist A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, wydanie 2. 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. i Shaw S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69: 1 017–1 059.
- (19) Grime J.P., Hodgson J.G. i Hunt R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., Londyn.
- (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. i 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. i 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. i 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. i 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. i 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. i 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. i Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. *BCPC – Weeds*, s. 1021–1028.
 - (28) McKelvey R.A., Wright J.P. i 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. Informacje własne. (<http://www.herbiseed.com>)
 - (30) Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA), Służba Ochrony Zasobów Naturalnych (NRCS). 2004. The Plants Database, wersja 3.5 (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 STANY ZJEDNOCZONE.
 - (31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych / Biuro Programów Pestycydowych / Wydział Losów i Skutków Środowiskowych / Dział Epidemiologii Środowiskowej].
 - (32) Webster, R.H. 1979. Sprawozdanie techniczne nr 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.
 - (33) White A. L. i Boutin C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Informacje własne.
 - (34) Zwerger P. i 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.
-

Dodatek 4

Przykłady odpowiednich warunków wzrostu w przypadku niektórych gatunków roślin uprawnych

Następujące warunki uznano za odpowiednie w przypadku 10 gatunków roślin uprawnych – można je potraktować jako wytyczne na potrzeby badań w komorach wzrostu również w przypadku niektórych innych gatunków:

stężenie dwutlenku węgla: 350 ± 50 ppm;

wilgotność względna: 70 ± 5 % podczas okresów oświetlenia i 90 ± 5 % podczas okresów braku światła;

temperatura: 25 ± 3 °C w ciągu dnia, 20 ± 3 °C w nocy;

fotoperiod: 16 godz. światła / 8 godz. bez dostępu światła, przy średniej długości fali wynoszącej 400–700 nm;

światło: luminacja wynosząca 350 ± 50 mE/m²/s, mierzona ponad roślinami.

Gatunki roślin uprawnych:

- pomidor (*Solanum lycopersicon*);
 - ogórek (*Cucumis sativus*);
 - sałata (*Lactuca sativa*);
 - soja (*Glycine max*);
 - kapusta (*Brassica oleracea* var. *capitata*);
 - marchew (*Daucus carota*);
 - owies zwyczajny (*Avena sativa*);
 - życica trwała (*Lolium perenne*);
 - kukurydza zwyczajna (*Zea mays*);
 - cebula (*Allium cepa*).
-

C.32. BADANIE ROZRODCZOŚCI WAZONKOWCOWATYCH**WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 220 (2004). Opracowana została w celu oceny wpływu działania substancji chemicznych na zdolność rozrodczą wazonkowcowatych, *Enchytraeus albidus* (Henle 1873), w glebie. Zasadniczo bazuje ona na metodzie opracowanej przez niemiecki Umweltbundesamt (1), która została poddana badaniu międzylaboratoryjnemu (2). Wzięto również pod uwagę inne metody badania toksyczności substancji chemicznych wobec wazonkowcowatych i dżdżownic (3)(4)(5)(6)(7)(8).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

2. Żyjące w glebie pierścienice z rodzaju wazonkowcowatych (*Enchytraeus*) są gatunkiem istotnym pod względem ekologicznym dla badań ekotoksykologicznych. Chociaż wazonkowce często występują w glebach zasiedlonych przez dżdżownice, prawdą jest również, iż często licznie występują one w wielu glebach, w których dżdżownice nie występują. Wazonkowce można stosować w badaniach laboratoryjnych, jak również w badaniach w warunkach terenowych lub zbliżonych do terenowych. Z praktycznego punktu widzenia hodowla wielu gatunków wazonkowcowatych nie nastręcza trudności pod względem utrzymania i hodowli, a czas życia pokolenia jest znacznie krótszy niż w przypadku dżdżownic. Czas trwania badania rozrodczości wazonkowców wynosi więc zaledwie 4–6 tygodni, zaś w przypadku dżdżownic (*Eisenia fetida*) – 8 tygodni.
3. Podstawowe informacje dotyczące ekologii i ekotoksykologii wazonkowców w środowisku lądowym znaleźć można w (9)(10)(11)(12).

ZASADA BADANIA

4. Dorosłe osobniki wazonkowców poddaje się narażeniu na działanie szeregu stężeń substancji chemicznej wymieszanej ze sztuczną glebą. Badanie można podzielić na dwa etapy: a) badanie ustalające zakres stężeń (w przypadku gdy brakuje dostatecznych informacji), w którym śmiertelność stanowi główny punkt końcowy oceniany po dwóch tygodniach narażenia oraz b) ostateczne badanie rozrodczości, w którym ocenie podlega całkowita liczba młodych osobników wyprodukowanych przez zwierzę rodzicielskie oraz przeżycie zwierząt rodzicielskich. Czas trwania badania ostatecznego wynosi sześć tygodni. Po pierwszych trzech tygodniach usuwa się osobniki dorosłe i odnotowuje zmiany morfologiczne. Po kolejnych trzech tygodniach liczy się potomstwo wyklute z kokonów wyprodukowanych przez osobniki dorosłe. Zdolność rozrodczą zwierząt narażonych na badaną substancję chemiczną porównuje się z próbami kontrolnymi w celu określenia (i) stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub (ii) EC_x (np. EC_{10} , EC_{50}), stosując model regresji w celu oszacowania stężenia, które spowoduje zmniejszenie zdolności rozrodczej o x %. Badane stężenia powinny zawierać w swoim zakresie EC_x (np. EC_{10} , EC_{50}), aby EC_x wynikało raczej z interpolacji niż ekstrapolacji.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

5. W miarę możliwości należy znać rozpuszczalność w wodzie, $\log K_{ow}$, współczynnik podziału gleba/woda (np. rozdziały C.18 lub C.19 niniejszego załącznika) oraz prężność pary badanej substancji chemicznej. Pożądane są dodatkowe informacje na temat losów badanej substancji chemicznej w glebie, takie jak wskaźniki fotolizy i hydrolizy.
6. Niniejszą metodą badawczą można stosować w odniesieniu do substancji chemicznych rozpuszczalnych albo nierozpuszczalnych w wodzie. Sposób zastosowania badanej substancji chemicznej będzie się jednak odpowiednio różnił. Metoda badawcza nie ma zastosowania do lotnych substancji chemicznych, np. substancji chemicznych, w odniesieniu do których stała Henry'ego lub współczynnik podziału powietrze/woda są większe niż jeden, lub substancji chemicznych, w odniesieniu do których prężność pary przekracza 0,0133 Pa w temperaturze 25 °C.

WAŻNOŚĆ BADANIA

7. Aby badanie było ważne, powinny być spełnione następujące kryteria wykonania w przypadku prób kontrolnych:
 - śmiertelność osobników dorosłych na koniec badania ustalającego zakres i po pierwszych trzech tygodniach badania rozrodczości nie powinna przekraczać 20 %,
 - zakładając, że badanie rozpoczęto z 10 dorosłymi osobnikami na naczynie, na koniec badania powinno zostać wyprodukowanych średnio co najmniej 25 młodych osobników na naczynie,
 - współczynnik zmienności w odniesieniu średniej liczby młodych osobników nie powinien być wyższy niż 50 % na koniec badania rozrodczości.

Jeżeli badanie nie spełni powyższych kryteriów ważności, należy je zakończyć, chyba że przedstawić można uzasadnienie kontynuacji badania. Uzasadnienie należy włączyć do sprawozdania z badania.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

8. Substancję chemiczną odniesienia należy badać w równych odstępach czasu lub ewentualnie włączyć do każdego badania w celu zweryfikowania, czy reakcja organizmów użytych do badania nie zmieniła się znacznie z czasem. Odpowiednią substancją chemiczną odniesienia jest karbendazym, w przypadku którego wykazano wpływ na przeżycie i rozrodczość wazonkowców (13)(14), albo inne substancje chemiczne, w przypadku których dane dotyczące toksyczności są dobrze znane. W badaniu międzylaboratoryjnym zastosowano preparat karbendazymu znany pod nazwą handlową Derosal™, dostarczany przez AgrEvo Company (Frankfurt, Niemcy), zawierający 360 g/l (32,18 %) substancji czynnej (2). Określone w badaniu międzylaboratoryjnym EC₅₀ dla rozrodczości mieściło się w zakresie 1,2 ± 0,8 mg substancji czynnej na kilogram suchej masy (2). Jeżeli badana seria obejmuje pozytywną normę toksyczną, stosuje się jedno stężenie i liczba kontrprób powinna być taka sama jak w przypadku prób kontrolnych. W przypadku karbendazymu zaleca się badanie 1,2 mg substancji czynnej na kilogram suchej masy (badanej w płynnej postaci).

OPIS BADANIA

Wypożyczenie

9. Naczynia badawcze powinny być wykonane ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Odpowiednie są szklane słoje (np. o objętości 0,20–0,25 litra i średnicy ≈ 6 cm). Naczynia powinny mieć przezroczyste pokrywki (np. szklane lub z polietylenu), które mają ograniczyć parowanie wody, jednocześnie umożliwiając wymianę gazów między glebą a atmosferą. Pokrywki powinny być przezroczyste, aby zapewnić przepuszczalność światła.
10. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, w szczególności następujące urządzenia:
 - suszarka szafkaowa;
 - mikroskop stereoskopowy;
 - pehametr i fotometr;
 - odpowiednie dokładne wagi;
 - odpowiedni sprzęt do regulacji temperatury;
 - odpowiedni sprzęt do regulacji wilgotności (nie jest konieczny, jeżeli naczynia narażone na działanie substancji mają pokrywki);
 - inkubator lub małe pomieszczenie z regulacją temperatury;
 - pincety, haczyki lub ezy;
 - kuweta fotograficzna.

Przygotowanie sztucznej gleby

11. W niniejszym badaniu zastosowano sztuczną glebę (5)(7) o następującym składzie (w oparciu o masy suche, suszone do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C):
 - 10 % torfu sfagnowego, suszonego na powietrzu i drobno zmielonego (dopuszczalna wielkość cząstek 2 ± 1 mm); zaleca się sprawdzenie, czy gleba przygotowana ze świeżą partią torfu nadaje się do hodowli organizmów przed zastosowaniem jej w badaniu;
 - 20 % glinki kaolinowej (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

- około 0,3–1,0 % węgla wapnia (sproszkowanego CaCO_3 do analizy), aby otrzymać $\text{pH } 6,0 \pm 0,5$; ilość dodawanego węgla wapnia może zależeć przede wszystkim od jakości/rodzaju torfu;
- około 70 % kwarcowego piasku suszonego na powietrzu (w zależności od potrzebnej ilości CaCO_3), głównie drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek ma wymiary 50–200 mikronów.

W przypadku sztucznej gleby przed jej wykorzystaniem do badania ostatecznego należy wykazać jej przydatność do hodowli organizmów i stosowność pod względem spełnienia kryteriów ważności. Jest to zalecane zwłaszcza w celu upewnienia się, że przeprowadzenie badania nie zostanie zakłócone, jeżeli zawartość węgla organicznego w sztucznej glebie zmniejszy się, np. w wyniku obniżenia zawartości torfu do 4–5 % oraz odpowiedniego zwiększenia zawartości piasku. Dzięki takiemu zmniejszeniu zawartości węgla organicznego mogą zmniejszyć się możliwości adsorpcji badanej substancji chemicznej do gleby (węgiel organiczny), a dostępność badanej substancji chemicznej dla organizmów może wzrosnąć. Wykazano, że gatunek *Enchytraeus albidus* może spełniać kryteria ważności dotyczące rozrodczości, jeśli bada się go w glebach naturalnych o niższej zawartości węgla organicznego niż wymienione powyżej (np. 2,7 %) (15) oraz istnieją, ograniczone wprawdzie, doświadczenia pokazujące, że pozwala na to również zastosowanie sztucznej gleby przy zawartości torfu na poziomie 5 %.

Uwaga: W przypadku zastosowania gleby naturalnej w dodatkowych badaniach (np. wyższego rzędu) należy również określić przydatność gleby i stosowność pod względem spełnienia kryteriów ważności.

12. Suche składniki gleby dokładnie miesza się (np. w dużym mieszalniku laboratoryjnym). Taką czynność należy przeprowadzić przynajmniej tydzień przed rozpoczęciem badania. Wymieszaną glebę należy przechowywać przez dwa dni w celu zrównoważenia/ustabilizowania kwasowości. W celu określenia pH stosuje się mieszaninę gleby i 1-molowego roztworu chlorku potasu (KCl) lub 0,01-molowego roztworu chlorku wapnia (CaCl_2) w stosunku 1:5 (zob. (16) i dodatek 3). Jeżeli kwasowość gleby przekracza wymagany zakres (zob. pkt 11), można ją dostosować, dodając odpowiednią ilość CaCO_3 . Jeżeli gleba jest zbyt zasadowa, można to skorygować, dodając większą ilość mieszaniny, o której mowa w pkt 11, lecz z wyłączeniem CaCO_3 .
13. Maksymalną pojemność wodną sztucznej gleby ustala się zgodnie z procedurami określonymi w dodatku 2. Jeden lub dwa dni przed rozpoczęciem badania suchą sztuczną glebę nawilża się wstępnie, dodając odpowiednią ilość wody dejonizowanej w celu uzyskania około połowy końcowej zawartości wody, stanowiącej 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby. Na początku badania wstępnie nawilżoną glebę dzieli się na części odpowiadające liczbie badanych stężeń (i w stosownych przypadkach substancji chemicznych odniesienia) oraz prób kontrolnych zastosowanych w badaniu. Zawartość wilgoci dostosowuje się, aby osiągnąć 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby, dodając roztwór badanej substancji chemicznej lub wodę destylowaną albo dejonizowaną (zob. pkt 19–21). Zawartość wilgoci określa się na początku i na końcu badania (w wyniku suszenia do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C) i powinna ona mieścić się w przedziale optymalnym dla przetrwania organizmów. Przybliżoną ocenę zawartości wilgoci w glebie można wykonać, ściskając glebę delikatnie w rękach – jeżeli zawartości wilgoci w glebie jest odpowiednia, pomiędzy palcami powinny pojawić się małe krople wody.

Wybór i przygotowanie zwierząt użytych do badania

14. Zaleca się wykorzystanie w badaniu gatunku *Enchytraeus albidus* (Henle 1837) (wazonkowiec biały), należącego do rodziny *Enchytraeidae* (rząd *Oligochaeta*, typ *Annelida*). *E. albidus* jest jednym z największych gatunków wazonkowców – odnotowano osobniki o długości do 35 mm (17)(18). *E. albidus* występuje na całym świecie, w siedliskach morskich, słodkowodnych i lądowych, głównie w rozkładającej się materii organicznej (wodorosty, kompost) oraz rzadziej na łąkach (9). Duża tolerancja ekologiczna tego gatunku oraz niektóre różnice morfologiczne mogą wskazywać na istnienie różnych ras.
15. *E. albidus* jest dostępny w handlu jako karma dla ryb. Należy sprawdzić, czy hodowla jest zanieczyszczona innymi, zazwyczaj mniejszymi, gatunkami (1) (19). Jeśli zanieczyszczenie występuje, wszystkie organizmy należy wypłukać w wodzie w szalce Petriego. Następnie w celu rozpoczęcia nowej hodowli wybiera się duże dorosłe osobniki z gatunku *E. albidus* (przy użyciu mikroskopu stereoskopowego), a wszystkie inne organizmy odrzuca się. Gatunek *E. albidus* można z łatwością hodować w wielu różnych materiałach organicznych (zob. dodatek 4). Cykl życia *E. albidus* jest krótki, ponieważ organizmy osiągają dojrzałość w okresie od 33 dni (przy temperaturze 18 °C) do 74 dni (przy temperaturze 12 °C) (1). W badaniu wykorzystuje się wyłącznie hodowle utrzymywane w laboratorium bez żadnych problemów przez co najmniej 5 tygodni (jedno pokolenie).

16. Inne gatunki z rodzaju *Enchytraeus* również nadają się do wykorzystania w badaniu np. *E. buchholzi* (Vejdovsky 1879) lub *E. crypticus* (Westheide i Graefe 1992) (zob. dodatek 5). W przypadku wykorzystania innych gatunków *Enchytraeus* należy je wyraźnie zidentyfikować oraz uzasadnić taki wybór.
17. Do badań używa się osobników dorosłych. Powinny one posiadać jaja (białek plamki) w okolicach siodełka i powinny być w przybliżeniu tej samej wielkości (około 1 cm długości). Synchronizacja hodowli nie jest konieczna.
18. Jeżeli wazonkowców nie hoduje się w tego samego rodzaju glebie i w tych samych warunkach (włącznie z karmieniem) co wykorzystane w ostatecznym badaniu, organizmy należy aklimatyzować przez co najmniej 24 godziny do trzech dni. Początkowo aklimatyzować należy większą liczbę dorosłych osobników niż liczba konieczna do przeprowadzenia badania, aby umożliwić ewentualne odrzucenie uszkodzonych lub nienadających się z innych względów osobników. Na koniec okresu aklimatyzacji do badania wybiera się tylko organizmy posiadające jaja oraz niewykazujące żadnych anomalii w zachowaniu (np. próba ucieczki z gleby). Organizmy te ostrożnie usuwa się za pomocą pęset jubilerskich, haczyków lub ez i umieszcza w szalce Petriego zawierającej niewielką ilość wody słodkiej. Jak zasugerowano w rozdziale C.20 niniejszego załącznika (Badanie rozrodczości gatunku *Daphnia magna*), zaleca się zastosowanie w tym celu regenerowanej wody słodkiej, ponieważ woda dejonizowana, demineralizowana lub wodociągowa może być szkodliwa dla organizmów. Organizmy bada się pod mikroskopem stereoskopowym i odrzuca się wszystkie, które nie zawierają jaj. Należy zwrócić uwagę, aby usunąć i odrzucić wszelkie roztocza lub skoczogonki, które mogły zanieczyścić hodowlę. Zdrowe osobniki niewykorzystane do badania umieszcza się z powrotem w hodowli wyjściowej.

Przygotowywanie badanych stężeń

Badana substancja chemiczna rozpuszczalna w wodzie

19. Roztwór badanej substancji chemicznej przygotowuje się w wodzie dejonizowanej w ilości wystarczającej do wszystkich kontrprób w ramach jednego badanego stężenia. Zaleca się zastosowanie odpowiedniej ilości wody, aby osiągnąć wymaganą wilgotność, tj. 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby (zob. pkt 13). Przed wprowadzeniem do naczynia badawczego każdy roztwór badanej substancji chemicznej dokładnie miesza się z jedną partią wstępnie nawilżonej gleby.

Badana substancja chemiczna nierozpuszczalna w wodzie

20. W przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w wodzie, ale rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych, badaną substancję chemiczną można rozpuścić w jak najmniejszej ilości odpowiedniego nośnika (np. acetonu). Należy stosować jedynie lotne rozpuszczalniki. Nośnik natryskuje się na niewielką ilość, na przykład 2,5 g, drobnego piasku kwarcowego albo miesza się go z piaskiem. Nośnik usuwa się, odparowując go przez co najmniej godzinę pod okapem wyciągowym. Tę mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do wstępnie nawilżonej gleby i dokładnie miesza po dodaniu odpowiedniej ilości wody dejonizowanej w celu osiągnięcia wymaganej wilgotności. Otrzymaną mieszaninę umieszcza się w naczyniach badawczych.
21. W przypadku substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie i rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych miesza się odpowiednią ilość badanej substancji chemicznej z ekwiwalentem 2,5 g drobno zmielonego piasku kwarcowego na jedno naczynie badawcze w celu otrzymania pożądanego badanego stężenia. Taką mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do wstępnie nawilżonej gleby i dokładnie miesza po dodaniu odpowiedniej ilości wody dejonizowanej w celu osiągnięcia wymaganej wilgotności. Otrzymaną mieszaninę przekłada się do naczyń badawczych. Procedurę tę powtarza się dla każdego badanego stężenia, a także przygotowuje się odpowiednią próbę kontrolną.
22. Substancji chemicznych nie należy zazwyczaj badać w stężeniach wyższych niż 1 000 mg/kg suchej masy gleby. Badanie wyższych stężeń może być jednak konieczne ze względu na cele danego badania.

WYKONANIE BADAŃ

Grupy badane i kontrolne

23. W przypadku każdego badanego stężenia w naczyniu badawczym umieszcza się ilość badanej gleby odpowiadającą 20 g suchej masy (zob. pkt 19–21). Przygotowuje się również próby kontrolne niezawierające badanej substancji chemicznej. Do każdego z naczyń dodaje się pokarm zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 29. Do każdego naczynia badawczego losowo przydziela się dziesięć organizmów. Organizmy przenosi się

ostrożnie do każdego z naczyń badawczych i umieszcza na powierzchni gleby za pomocą na przykład pincet jubilerskich, haczyków lub ez. Liczba kontrprób w odniesieniu do badanych stężeń oraz w odniesieniu do prób kontrolnych zależy od zastosowanego projektu badania (zob. pkt 34). Naczynia badawcze rozmieszcza się losowo w inkubatorze badawczym i losowo zmienia ich położenie raz na tydzień.

24. Jeżeli zastosowano nośnik w celu dodania badanej substancji chemicznej, oprócz serii badanej należy przygotować jedną serię prób kontrolnych zawierających piasek kwarcowy spryskany rozpuszczalnikiem lub z nim wymieszany. Stężenie rozpuszczalnika lub środka dyspergującego powinno być takie samo jak stężenie zastosowane w naczyniach badawczych zawierających badaną substancję chemiczną. Serię kontrolną zawierającą dodatkowy piasek kwarcowy (2,5 g na naczynie) należy zbadać pod kątem substancji chemicznych, które wymagają wprowadzenia zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 21.

Warunki badania

25. Badanie przeprowadza się w temperaturze 20 ± 2 °C. Aby zapobiec ucieczce organizmów z gleby, badanie przeprowadza się w warunkach kontrolowanych cykli światło–ciemność (najlepiej 16 godzin światła i 8 godzin bez dostępu światła) z natężeniem światła na obszarze z naczyniami badawczymi na poziomie 400–800 luksów.
26. W celu kontrolowania wilgotności gleby naczynia waży się na początku badania, a następnie raz w tygodniu. Utratę masy uzupełnia się, dodając odpowiednią ilość wody dejonizowanej. Należy zauważyć, że utratę wody można ograniczyć dzięki utrzymaniu wysokiej wilgotności powietrza (> 80 %) w inkubatorze badawczym.
27. Zawartość wilgoci i pH należy mierzyć na początku i na końcu badania ustalającego zakres stężeń i badania ostatecznego. Pomiary należy wykonać w próbach kontrolnych i próbach gleby poddanych zabiegowi (wszystkie stężenia), przygotowanych i utrzymywanych w taki sam sposób jak badane hodowle, ale niezawierających organizmów. Pokarm należy dodać do tych próbek gleby tylko na początku badania w celu ułatwienia aktywności mikroorganizmów. Należy dodać taką samą ilość pokarmu jak w przypadku badanych hodowli. Dodawanie więcej pokarmu do tych naczyń podczas badania nie jest konieczne.

Karmienie

28. Można zastosować pokarm umożliwiający utrzymanie populacji wazonkowców. Stwierdzono, że odpowiedni pokarm stanowią płatki owsiane, najlepiej przed zastosowaniem poddane obróbce w autoklawie (właściwe jest również podgrzewanie) w celu uniknięcia zanieczyszczeń mikrobiologicznych.
29. Pokarm jest podawany w ten sposób, że przed wprowadzeniem organizmów najpierw w każdym naczyniu jest mieszane 50 mg zmielonych płatków owsianych z glebą. Następnie pokarm podaje się raz w tygodniu aż do 21. dnia. W 28. dniu nie podaje się pokarmu, ponieważ osobniki dorosłe zostały już na tym etapie usunięte, a młode osobniki potrzebują od tego momentu stosunkowo mało dodatkowego pokarmu. Karmienie podczas badania polega na ostrożnym umieszczeniu na powierzchni gleby 25 mg zmielonych płatków owsianych, tak aby uniknąć uszkodzenia organizmów. W celu ograniczenia rozwoju grzybów płatki owsiane należy zakopać w glebie, przykrywając niewielkimi ilościami gleby. Jeżeli pokarm nie zostaje zjedzony, dawkę należy zmniejszyć.

Projekt badania ustalającego zakres

30. W stosownych przypadkach przeprowadza się badanie ustalające zakres, stosując np. pięć stężeń badanej substancji chemicznej wynoszących 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg (suchej masy gleby). Jedna kontrpróba dla każdej grupy badanej i kontrolnej jest wystarczająca.
31. Badanie ustalające zakres trwa dwa tygodnie. Po zakończeniu badania określa się śmiertelność organizmów. Organizm odnotowuje się jako martwy, jeżeli przedni koniec ciała nie wykazuje żadnej reakcji na bodźce mechaniczne. Dodatkowe informacje dotyczące śmiertelności mogą okazać się przydatne również przy podejmowaniu decyzji dotyczącej zakresu stężeń, jakie mają zostać użyte w badaniu ostatecznym. Należy w związku z tym odnotować również wszelkie zmiany w zachowaniu (np. niezdolność zakopywania się w glebie; leżenie w bezruchu przy szklanej ścianie naczynia badawczego) i w morfologii (np. występowanie otwartych ran) osobników dorosłych, jak również występowanie ewentualnych młodych. Tę ostatnią informację można ustalić, stosując metodę barwienia opisaną w dodatku 6.

32. LC_{50} można w przybliżeniu określić, obliczając średnią geometryczną danych dotyczących śmiertelności. Przy wyznaczaniu zakresu stężeń do badania ostatecznego zakłada się, że wpływ na rozrodczość jest niższy niż LC_{50} o krotność nieprzekraczającą 10. Jest to jednak zależność empiryczna i może się ona różnić w szczególnych przypadkach. Dodatkowe obserwacje poczynione w badaniu ustalającym zakres, takie jak występowanie osobników młodych, mogą pomóc udoskonalić zakres stężeń badanej substancji chemicznej, który zostanie wykorzystany w badaniu ostatecznym.
33. W celu dokładnego wyznaczenia LC_{50} zaleca się przeprowadzenie badania z zastosowaniem co najmniej czterech kontrprób każdego stężenia badanej substancji chemicznej oraz odpowiedniej liczby stężeń, tak aby uzyskać co najmniej cztery statystycznie istotnie różne średnie reakcje przy tych stężeniach. W przypadku prób kontrolnych, jeżeli zostały one wykorzystane, stosuje się podobną liczbę stężeń i kontrprób.

Projekt ostatecznego badania rozrodczości

34. W oparciu o zalecenia wynikające z badania międzylaboratoryjnego proponowane są trzy układy (2):
- w celu wyznaczenia NOEC należy zbadać co najmniej pięć stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego badanego stężenia i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 1,8-krotność poprzedniego;
 - W celu określenia EC_x (np. EC_{10} , EC_{50}) należy zbadać co najmniej pięć stężeń, które powinny zawierać w swoim zakresie EC_x w celu umożliwienia interpolacji, a nie ekstrapolacji EC_x . Zaleca się zastosowanie co najmniej czterech kontrprób dla każdego badanego stężenia oraz czterech kontrprób kontrolnych. Współczynnik rozstawienia stężeń może być zróżnicowany, tj. może być równy lub mniejszy niż 1,8 w oczekiwanym przedziale skutków oraz może przekraczać 1,8 przy wyższych i niższych stężeniach;
 - połączone podejście umożliwia wyznaczenie zarówno NOEC, jak i EC_x . Należy zastosować osiem badanych stężeń uporządkowanych w szeregu geometrycznym. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego zabiegu i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 1,8-krotność poprzedniego;
35. Należy zastosować dziesięć osobników dorosłych na naczynie badawcze (zob. pkt 23). Pokarm dodaje się do naczyń badawczych w momencie rozpoczęcia badania, a następnie raz w tygodniu (zob. pkt 29) do 21. dnia włącznie. W 21. dniu próbki gleby dokładnie przeszukuje się ręcznie, a żyjące osobniki dorosłe poddaje się obserwacji, liczy i odnotowuje wszelkie zmiany w zachowaniu (np. niezdolność zakopywania się w glebie; leżenie w bezruchu przy szklanej ścianie naczynia badawczego) i w morfologii (np. otwarte rany). Następnie wszystkie osobniki dorosłe usuwa się z naczyń badawczych i badanej gleby. Badaną glebę zawierającą jakiegokolwiek wyprodukowane kokony inkubuje się przez trzy kolejne tygodnie w takich samych warunkach badania, z tym że pokarm podaje się tylko w 35. dniu (tj. 25 mg zmielonych płatków owsianych na naczynie).
36. Po sześciu tygodniach liczy się nowo wyklute osobniki. Zaleca się zastosowanie metody opartej na barwieniu różem bengalskim (zob. dodatek 6), chociaż odpowiednie okazały się również inne metody ekstrakcji i flotacji na mokro (ale bez ogrzewania) (zob. dodatek 6) (4)(10)(11)(20). Zaleca się zastosowanie barwienia różem bengalskim, ponieważ ekstrakcja na mokro z podłoża glebowego może zostać utrudniona przez zmętnienie spowodowane zawieszonymi cząstkami gliny.

Badanie graniczne

37. Jeżeli w badaniu ustalającym zakres nie zaobserwowano żadnych efektów przy najwyższym stężeniu (tj. 1 000 mg/kg), jako badanie graniczne można przeprowadzić badanie rozrodczości, stosując stężenie 1 000 mg/kg, w celu wykazania, że NOEC w przypadku rozrodczości jest wyższe niż ta wartość.

Streszczenie i harmonogram badania

38. Etapy badania można podsumować następująco:

Czas	Badanie ustalające zakres stężeń	Badanie ostateczne
Dzień – 7 lub wcześniej	— przygotowanie sztucznej gleby (wymieszanie suchych składników)	— przygotowanie sztucznej gleby (wymieszanie suchych składników)
Dzień – 5	— sprawdzenie pH sztucznej gleby — dokonanie pomiaru maksymalnej pojemności wodnej gleby	— sprawdzenie pH sztucznej gleby — dokonanie pomiaru maksymalnej pojemności wodnej gleby
Dzień – 5 do – 3	— sortowanie organizmów w celu aklimatyzacji	— sortowanie organizmów w celu aklimatyzacji
Dni od – 3 do 0	— aklimatyzowanie organizmów przez co najmniej 24 godz.	— aklimatyzowanie organizmów przez co najmniej 24 godz.
Dzień – 1	— wstępne nawilżenie sztucznej gleby i rozmieszczenie jej w partiach	— wstępne nawilżenie sztucznej gleby i rozmieszczenie jej w partiach
Dzień 0	— sporządzenie roztworów podstawowych — wprowadzenie badanej substancji chemicznej — odważenie podłoża badawczego do naczyń badawczych — wmieszanie pokarmu — wprowadzenie organizmów — dokonanie pomiaru pH i wilgotności gleby	— sporządzenie roztworów podstawowych — wprowadzenie badanej substancji chemicznej — odważenie podłoża badawczego do naczyń badawczych — wmieszanie pokarmu — wprowadzenie organizmów — dokonanie pomiaru pH i wilgotności gleby
Dzień 7	— sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie	— sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie — karmienie
Dzień 14	— określenie śmiertelności osobników dorosłych — oszacowanie liczby osobników młodych — dokonanie pomiaru pH i wilgotności gleby	— sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie — karmienie
Dzień 21		— obserwacja zachowań osobników dorosłych — usunięcie osobników dorosłych — określenie śmiertelności osobników dorosłych — sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie — karmienie
Dzień 28		— sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie — brak karmienia

Czas	Badanie ustalające zakres stężeń	Badanie ostateczne
Dzień 35		— sprawdzenie zawartości wilgoci w glebie — karmienie
Dzień 42		— liczenie młodych osobników — dokonanie pomiaru pH i wilgotności gleby

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

39. Oprócz przeglądu zamieszczonego w dodatku 7 w ramach niniejszej metody badawczej nie podaje się żadnych definitywnych wytycznych statystycznych na potrzeby analizy wyników badania.
40. W badaniu ustalającym zakres głównym punktem końcowym jest śmiertelność. Należy jednak odnotować również wszelkie zmiany w zachowaniu (np. niezdolność zakopywania się w glebie; leżenie w bezruchu przy szklanej ścianie naczynia badawczego) i w morfologii (np. otwarte rany) osobników dorosłych, jak również ewentualne występowanie młodych. W celu wyznaczenia LC_{50} zwykle stosuje się analizę probitową (21) albo regresję logistyczną. Niemniej w przypadkach, w których ta metoda analizy jest nieodpowiednia (np. jeśli dostępne są mniej niż trzy stężenia, które doprowadziły do częściowej śmiertelności), można zastosować alternatywne metody. Wspomniane metody mogą obejmować średnie kroczące (22), uproszczoną metodę Spearmana-Kärbera (23) albo prostą interpolację (np. średnia geometryczna LC_0 i LC_{100} , obliczona jako pierwiastek kwadratowy LC_0 pomnożony przez LC_{100}).
41. W badaniu ostatecznym punktem końcowym jest płodność (tj. liczba wykluć młodych). Podobnie jak w przypadku badania ustalającego zakres wszystkie pozostałe objawy szkodliwości należy jednak również odnotować w sprawozdaniu końcowym. Do celów analizy statystycznej dotyczącej rozrodczości wymagane jest obliczenie średniej arytmetycznej oraz odchylenia standardowego w odniesieniu do grupy badanej i grupy kontrolnej.
42. Jeżeli przeprowadzono analizę wariancji, odchylenie standardowe (s) i stopnie swobody (df) można zastąpić odpowiednio połączonym oszacowaniem wariancji uzyskanym z analizy wariancji i jego stopniem swobody, pod warunkiem że wariancja nie jest uzależniona od stężenia. W takim przypadku należy zastosować pojedyncze wariancje grupy kontrolnej i grup badanych. Wartości te oblicza się zwykle za pomocą dostępnego na rynku oprogramowania statystycznego, stosując wyniki uzyskane w odniesieniu do naczynia jako kontrpróby. Jeżeli zasadne wydaje się łączenie danych na potrzeby prób kontrolnych negatywnych i prób kontrolnych z rozpuszczalnikami zamiast badania pod kątem jednej z nich, należy zbadać te dane, aby sprawdzić, czy nie są one wyraźnie odmienne (w celu ustalenia odpowiednich badań zob. pkt 45 i dodatek 7).
43. Dalsze badanie i wnioskowanie statystyczne jest uzależnione od tego, czy wartości kontrpróby są normalnie rozłożone i jednorodne w odniesieniu do ich wariancji.

Oszacowanie NOEC

44. Preferowane powinno być stosowanie silnych testów. Należy korzystać z informacji np. wynikających z wcześniejszych doświadczeń z badaniami międzylaboratoryjnymi lub z innych danych historycznych dotyczących tego, czy dane są w przybliżeniu normalnie rozłożone. Istotniejsza jest jednorodność wariancji (homoskedastyczność). Jak pokazuje doświadczenie, wariancja często wzrasta wraz z rosnącą średnią. W takich przypadkach transformacja danych może doprowadzić do homoskedastyczności. Transformacja taka powinna się jednak raczej opierać na doświadczeniu związanym z historycznymi danymi niż na danych będących przedmiotem analizy. W przypadku danych jednorodnych należy przeprowadzić wielokrotne testy t-Studenta, takie jak test Williamsa ($\alpha = 0,05$, jednostronny) (24)(25) albo w niektórych przypadkach test Dunnetta (26) (27). Należy zaznaczyć, że w przypadku nierównej replikacji wartości (t) z tabeli trzeba skorygować, jak sugerują Dunnett i Williams. Niekiedy ze względu na dużą wariancję reakcje nie wzrastają/zmniejszają się regularnie. W takim przypadku dużego odchylenia od monotoniczności bardziej odpowiedni jest test Dunnetta. Jeżeli występują odchylenia od homoskedastyczności, zasadne może być dokładniejsze zbadanie możliwego

wplywu na wariancje w celu ustalenia, czy można zastosować testy t-Studenta bez zbytejnej utraty mocy statystycznej (28). Ewentualnie można zastosować wielokrotny test Manna-Whitneya, np. z korektą Bonferroniego według Holma (29), albo test nieparametryczny [np. test Jonckheere'a-Terpstry (30)(31) lub Shirleya (32) (33)] w przypadku gdy dane te przejawiają heteroskedastyczność, ale poza tym są spójne z podstawową monotoniczną zależnością dawka-odpowiedź, i zasadniczo testy te są preferowane w stosunku do testów t-Studenta dla nierównych wariancji (zob. również schemat w dodatku 7).

45. Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne i warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur testów (normalność, jednorodność) są spełnione, można zastosować test t-Studenta w parach albo procedurę testu Manna-Whitneya (29).

Oszacowanie EC_x

46. W celu obliczenia dowolnej wartości EC_x po uzyskaniu odpowiedniej funkcji dawka-odpowiedź wykorzystuje się średnie z poszczególnych zabiegów do analizy regresji (liniowej albo nieliniowej). W odniesieniu do wzrostu osobników jako reakcji ciągłej wartości EC_x można oszacować, stosując odpowiednią analizę regresji (35). Wśród odpowiednich funkcji dla danych binarnych (śmiertelność/przeżycie oraz liczba potomstwa) znajdują się normalne funkcje: sigmoidalna, logistyczna lub Weibulla, zawierające dwa do czterech parametrów, z których część może również modelować reakcje hormetyczne. Jeżeli funkcję dawka-odpowiedź dopasowano za pomocą analizy regresji liniowej, przed oszacowaniem EC_x należy ustalić wysokie r^2 (współczynnik determinacji) lub nachylenie za pomocą analizy regresji, wstawiając wartość odpowiadającą x % średniej wartości próby kontrolnej do równania otrzymanego w wyniku analizy regresji. Granice ufności na poziomie 95 % oblicza się zgodnie z metodą Fiellera (przytoczoną przez Finneya (21)) lub innymi odpowiednimi współczesnymi metodami.
47. Ewentualnie reakcję modeluje się jako odsetek lub proporcję modelowego parametru, który interpretuje się jako średnią reakcję próby kontrolnej. W takich przypadkach normalną krzywą sigmoidalną (logistyczną, Weibulla) można często z łatwością dopasować do wyników, wykorzystując procedurę regresji probitowej (21). W takich przypadkach funkcję wagi trzeba dostosować na potrzeby odpowiedzi metrycznych, jak podaje Christensen (36). Jeżeli jednak zaobserwowano hormezę, analizę probitową należy zastąpić czteroparametrową funkcją logistyczną lub Weibulla, dopasowaną za pomocą procedury regresji nieliniowej (36). Jeżeli dopasowanie odpowiedniej funkcji dawka-odpowiedź do danych nie jest możliwe, wówczas do oszacowania EC_x i jego granic ufności można zastosować alternatywne metody, takie jak średnie kroczące za Thompsonem (22) i uproszczona procedura Spearmana-Kärbera (23).

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

48. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje.

Badana substancja chemiczna:

- właściwości fizyczne oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (np. rozpuszczalność w wodzie, prężność pary);
- tożsamość chemiczna badanej substancji chemicznej zgodnie z nomenklaturą IUPAC, numer CAS, partia, seria, wzór strukturalny i stopień czystości;
- termin ważności próbki.

Badany gatunek:

- zwierzęta użyte do badania: gatunek, nazwa systematyczna, źródło organizmów i warunki hodowli.

Warunki badania:

- składniki i przygotowanie sztucznej gleby;
- metoda podania badanej substancji chemicznej;
- opis warunków badania obejmujący temperaturę, wilgotność, pH itd.;
- dokładny opis projektu doświadczenia i procedur.

Wyniki badania:

- śmiertelność osobników dorosłych po dwóch tygodniach badania i liczba młodych osobników na koniec badania ustalającego zakres;
- śmiertelność osobników dorosłych po trzech tygodniach narażenia i dokładny wykaz młodych osobników na koniec badania ostatecznego;
- wszelkie zaobserwowane symptomy fizyczne lub patologiczne oraz zmiany w zachowaniu organizmów użytych do badania;
- wartości LC_{50} , NOEC lub EC_x (np. EC_{50} , EC_{10}) w odniesieniu do rozrodczości, jeżeli niektóre z nich mają zastosowanie z przedziałami ufności oraz wykres dopasowanego modelu użyty do ich obliczenia, wszystkie informacje i obserwacje pomocne w interpretacji wyników.

Odchylenia od procedur opisanych w niniejszej metodzie badawczej oraz wszelkie nietypowe zdarzenia, jakie miały miejsce podczas badania.

BIBLIOGRAFIA

- (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. i Moser T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 s.
- (3) Westheide, W. i Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, W: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Esser G. i Overdieck, D. (red.) s. 497–508. Elsevier, Amsterdam.
- (4) Dirven-Van Breemen E., Baerselmann R. i 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 s.
- (5) Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Toksyczność dla dżdżownic.
- (6) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, nr 11268-1. ISO, Genewa.
- (7) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, nr 11268-2 ISO, Genewa. ISO, Genewa.
- (8) Rundgren S. i A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). W: Løkke, H. i 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. i Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Nowy Jork.
- (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. i 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. i Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. W: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb R., Dott W. i Eisentraeger A. (red.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59–81.
- (16) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Determination of pH, nr 10390. ISO, Genewa.

- (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. i Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.
- (19) Bouguenec V. i Giani N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23: 9-22.
- (20) Korinkova J. i Sigmund J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.
- (21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (wydanie 3.), s. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, Londyn.
- (23) Hamilton M.A., R.C. Russo i R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.
- (24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- (25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.
- (26) Dunnett C.W., (1955). A multiple 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. i F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. Wydanie 2. W.H. Freeman and Company. Nowy Jork.
- (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. i J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.
-

Dodatek 1

Definicje

Do celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

EC_x (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływu na organizmy użyte do badania w danym okresie narażenia, w porównaniu z próbą kontrolną. W niniejszym badaniu wszystkie stężenia powodujące zmiany wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LC₀ (stężenie niepowodujące skutków śmiertelnych) to stężenie badanej substancji chemicznej, które nie prowadzi do śmierci żadnego z organizmów użytych do badania, narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC₀ wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LC₅₀ (mediana stężenia śmiertelnego) to stężenie badanej substancji chemicznej, które prowadzi do śmierci 50 % organizmów użytych do badania, narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC₅₀ wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LC₁₀₀ (stężenie całkowicie śmiertelne) to stężenie badanej substancji chemicznej, które prowadzi do śmierci 100 % organizmów użytych do badania, narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC₁₀₀ wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LOEC (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany) oznacza najniższe stężenie badanej substancji chemicznej mające statystycznie istotny skutek ($p < 0,05$). W niniejszym badaniu LOEC wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby. Wszystkie badane stężenia wyższe niż LOEC powinny normalnie wykazywać skutek, który różni się statystycznie od próby kontrolnej. Wszelkie odchylenia od powyższego podczas identyfikacji LOEC muszą być uzasadnione w sprawozdaniu z badania.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej bezpośrednio poniżej LOEC, przy którym nie obserwuje się żadnych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego skutku ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia, jeżeli porówna się je z próbą kontrolną.

Wskaźnik rozrodczości oznacza średnią liczbę młodych organizmów na daną liczbę osobników dorosłych w czasie trwania badania.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Określanie maksymalnej pojemności wodnej gleby**Określanie pojemności wodnej sztucznej gleby**

Następująca metoda została uznana za odpowiednią. Została ona opisana w załączniku C do normy ISO DIS 11268-2.

Pobrać określoną ilość (np. 5 g) badanej gleby z podłoża za pomocą odpowiedniego przyrządu (wybieraka ślimakowego itp.). Przykryć dno wybieraka kawałkiem bibuły filtracyjnej, a następnie, po napełnieniu wodą, umieścić wybierak na stelażu w łaźni wodnej. Wybierak należy stopniowo zanurzać aż do momentu, gdy poziom wody znajdzie się powyżej powierzchni gleby. Następnie należy zostawić go w wodzie na około trzy godziny. Ponieważ nie cała woda wchłonięta przez kapilary w glebie może zostać zatrzymana, należy umieścić wybierak na podłożu z wilgotnego drobno zmielonego piasku kwarcowego umieszczonego w zamkniętym naczyniu (aby zapobiec wysychaniu) na dwie godziny w celu odsączenia próbki gleby. Próbkę należy następnie zważyć, wysuszyć do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C. Pojemność wodną gleby (WHC) można następnie obliczyć w następujący sposób:

$$\text{WHC (w \% suchej masy)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdzie:

S = podłoże nasycone wodą + masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej

T = tara (masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej)

D = sucha masa podłoża

BIBLIOGRAFIA:

ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, nr 11268-2 ISO, Genewa. ISO, Genewa.

*Dodatek 3***Określenie pH gleby**

Podana poniżej metoda określania pH gleby opiera się na opisie zawartym w normie ISO 10390 (Jakość gleby – Oznaczanie pH).

Określoną ilość gleby suszy się w temperaturze pokojowej przez co najmniej 12 godzin. Następnie sporządza się zawiesinę gleby (zawierającą co najmniej 5 gramów gleby) w 1-molowym roztworze chlorku potasu czystego do analizy (KCl) lub 0,01-molowym roztworze chlorku wapnia czystego do analizy (CaCl_2) o objętości pięciokrotnie większej od objętości gleby. Otrzymaną zawiesinę wytrząsa się przez pięć minut. Następnie zawiesinę odstawia się do osadzenia na co najmniej 2 godziny, ale nie na dłużej niż 24 godziny. W fazie cieklej pH mierzy się za pomocą pehametru, który jest kalibrowany przed każdym pomiarem przy użyciu odpowiedniego szeregu roztworów buforowych (np. pH 4,0 i 7,0).

BIBLIOGRAFIA:

ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Determination of pH, nr 10390. ISO, Genewa.

Dodatek 4

Warunki hodowli *Enchytraeus* sp.

Organizmy z gatunku *Enchytraeus albidus* (a także inne gatunki z rodzaju *Enchytraeus*) można hodować w dużych skrzyniach z tworzywa sztucznego (np. o wymiarach 30 × 60 × 10 cm) wypełnionych mieszaniną gleby sztucznej i naturalnej niezanieczyszczonej gleby ogrodowej w stosunku 1:1. Należy unikać kompostu, ponieważ może on zawierać toksyczne substancje chemiczne, na przykład metale ciężkie. Przed wykorzystaniem gleby należy z niej usunąć faunę (np. przez głębokie zamrażanie). Można zastosować także podłoże zawierające wyłącznie sztuczną glebę, jednak wówczas wskaźnik rozrodczości może być niższy niż wskaźnik uzyskiwany przy zastosowaniu mieszanego podłoża glebowego. Podłoże stosowane w hodowli powinno mieć pH $6,0 \pm 0,5$.

Hodowlę prowadzi się bez dostępu światła w temperaturze $15-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Należy unikać temperatury wyższej niż 23 °C . Gleba powinna być wilgotna, lecz nie mokra. Odpowiednią zawartość wilgoci w glebie sprawdza się w następujący sposób: jeśli glebę delikatnie ściśnie się w dłoni, między palcami powinny pojawić się kropelki wody. Należy unikać warunków beztlenowych, dbając, aby pokrywy zbiorników z hodowlą umożliwiały odpowiednią wymianę gazową z atmosferą. Co tydzień glebę należy ostrożnie rozluźniać, aby ułatwić napowietrzanie.

Organizmy można karmić płatkami owsianymi. Płatki owsiane należy przechowywać w szczelnie zamykanych naczyniach, a przed użyciem należy je wysterylizować w autoklawie lub podgrzać, aby uniknąć infestacji roztoczy żerujących na pokarmach suchych (np. *Glyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) lub roztoczy drapieżnych (np. *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Po obróbce termicznej pokarm należy zemleć, aby łatwo było rozmieścić go na powierzchni gleby. Od czasu do czasu do płatków owsianych można dodać witaminy, mleko i olej z wątroby dorsza. Inne odpowiednie źródła pokarmu to drożdże piekarskie i pokarm dla ryb Tetramin.

Karmienie odbywa się w przybliżeniu dwa razy w tygodniu. Właściwą ilość płatków owsianych rozmieszcza się na powierzchni gleby lub ostrożnie miesza się z podłożem podczas rozluźniania gleby w celu ułatwienia napowietrzania. Bezwzględna ilość dostarczonego pokarmu zależy od liczby osobników w podłożu. Jako wskazówkę można przyjąć, że ilość pokarmu należy zwiększyć, jeżeli całość zostaje zjedzona w ciągu jednego dnia od podania. I odwrotnie, jeżeli pokarm wciąż pozostaje na powierzchni gdy nadchodzi pora drugiego karmienia (tydzień później), należy zredukować jego ilość. Pokarm, w którym rozwijają się grzyby, należy usunąć i wymienić. Po trzech miesiącach organizmy należy przenieść do świeżo przygotowanego podłoża.

Warunki hodowli uważa się za zadowalające, jeżeli organizmy: a) nie próbują opuścić podłoża glebowego; b) przekopują się szybko poprzez glebę, c) mają lśniącą zewnętrzną powłokę bez przyklejających się do niej cząstek gleby, d) mają mniej więcej białawą barwę, e) w hodowlach widoczne są organizmy w różnym wieku oraz f) rozmnażają się w sposób ciągły.

Dodatek 5

Wykonanie badania z innymi gatunkami *Enchytraeus*

Wybór gatunków

Można wykorzystywać gatunki inne niż *E. albidus*, lecz należy odpowiednio dostosować procedurę badania i kryteria ważności. Ponieważ wiele gatunków *Enchytraeus* jest łatwo dostępnych i można je z powodzeniem utrzymać w laboratorium, najważniejszym kryterium wyboru gatunku innego niż *E. albidus* jest adekwatność ekologiczna i, dodatkowo, porównywalna wrażliwość. Mogą również istnieć formalne powody zmiany gatunku. Na przykład w krajach, gdzie *E. albidus* nie występuje i nie może być importowany (np. ze względu na ograniczenia związane z kwarantanną), konieczne jest wykorzystanie innego gatunku *Enchytraeus*.

Przykłady odpowiednich gatunków alternatywnych

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide i Graefe 1992): ostatnio gatunek ten często wykorzystuje się w badaniach ekotoksikologicznych z uwagi na łatwość jego hodowli i badania. Jest to jednak gatunek o małym rozmiarze, co utrudnia jego stosowanie w porównaniu z *E. albidus* (w szczególności na etapach poprzedzających zastosowanie metody barwienia). Nie ma pewności, czy gatunek *E. crypticus* żyje w terenie, jako że jego opisy dotyczą wyłącznie hodowli dżdżownic. Tym samym nieznane są jego wymagania ekologiczne.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): nazwa ta prawdopodobnie obejmuje grupę blisko spokrewnionych gatunków, które trudno jest odróżnić morfologicznie. Nie zaleca używać go w badaniach, dopóki nie można będzie zidentyfikować gatunku osobników użytych do badania. *E. buchholzi* występuje zwykle na łąkach i obszarach, w których struktura gleby została naruszona, takich jak pobocza dróg.
- *Enchytraeus luxuriosus*: gatunek ten był początkowo znany jako *E. »minutus«*, został on jednak ostatnio opisany (1). Po raz pierwszy został znaleziony przez U. Graefe'a (Hamburg) na łące niedaleko St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Niemcy). *E. luxuriosus* jest o około połowę mniejszy od *E. albidus*, lecz większy niż inne omówione tutaj gatunki, co sprawia, że mógłby stanowić dobrą alternatywę dla *E. albidus*.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen i Christensen 1963): występowanie tego gatunku zgłaszano do tej pory w glebach mineralnych w Niemczech i Hiszpanii, gdzie występuje on powszechnie, ale zwykle niezbyt licznie. W porównaniu z innymi małymi gatunkami tego rodzaju jest on również stosunkowo łatwy do zidentyfikowania. Nie wiadomo nic na temat jego zachowania w badaniach laboratoryjnych ani na temat jego wrażliwości na substancje chemiczne. Uznano go jednak za łatwy w hodowli (E. Belotti, informacje własne).

Warunki hodowli

Wszystkie wspomniane wyżej gatunki *Enchytraeus* można hodować w tych samych podłożach, które są stosowane do hodowli *E. albidus*. W związku z ich mniejszym rozmiarem naczynia do hodowli mogą być mniejsze i, choć można stosować ten sam pokarm, trzeba dostosować wielkość dawki. Cykl życia tych gatunków jest krótszy niż cykl życia *E. albidus*, a karmienie powinno odbywać się częściej.

Warunki badania

Warunki badania są zasadniczo takie same jak warunki obowiązujące w przypadku *E. albidus*, z tym że:

- rozmiar naczynia badawczego może (ale nie musi) być mniejszy;
- czas trwania badania rozrodczości może (ale nie musi) być krótszy, tj. może wynosić cztery tygodnie zamiast sześciu; czas trwania badania ustalającego zakres powinien pozostać bez zmian;
- ze względu na niewielki rozmiar młodych organizmów metoda barwienia jest zdecydowanie zalecana na potrzeby liczenia;
- kryterium ważności związane z »liczbą młodych osobników na naczyniu badawcze w próbie kontrolnej« należy zmienić na »50«.

BIBLIOGRAFIA

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

Dodatek 6

Szczegółowy opis technik ekstrakcji

Barwienie różem bengalskim

Metoda ta, początkowo opracowana w ekologii limnicznej (1), została zaproponowana po raz pierwszy jako metoda liczenia młodych wazonkowców przez W. de Coena (Uniwersytet w Gandawie, Belgia). Zmodyfikowana wersja (róż bengalski zmieszany z formaldehydem zamiast etanolu) została opracowana niezależnie przez RIVM w Bilthoven (2) (3).

Po zakończeniu ostatecznego badania (tj. po sześciu tygodniach) glebę z naczyń badawczych przenosi się do płytkiego pojemnika. Przydatne w tym celu jest naczynie Bellaplast lub kuweta fotograficzna z bruzdami w dnie; »bruzdy« są istotne, ponieważ ograniczają ruch organizmów w polu obserwacji. Młode osobniki utrwala się etanolem (około 5 ml na kontrpróbę). Następnie naczynia wypełnia się wodą do wysokości 1–2 cm. Dodaje się kilka kropel (200–300 ml) różu bengalskiego (1-procentowy roztwór w etanolu; alternatywą jest 0,5-procentowa eozyna) i dokładnie miesza się oba składniki. Po 12 godzinach organizmy powinny być zabarwione na czerwony kolor i powinny dać się łatwo policzyć, ponieważ będą leżały na powierzchni podłoża. Ewentualnie przed rozpoczęciem liczenia organizmów mieszaninę substratu i alkoholu można przemyć na sicie (wielkość oczek: 0,250 mm). Przy zastosowaniu tej procedury kalionit, torf i część piasku zostaną wypłukane, a organizmy zabarwione na czerwono będą bardziej widoczne i łatwiejsze do policzenia. Zastosowanie podświetlanych soczewek (wielkość soczewki co najmniej 100 × 75 mm ze współczynnikiem powiększenia 2–3x) również ułatwi liczenie.

Technika barwienia skraca czas liczenia do kilku minut na naczynie i zasadniczo jedna osoba powinna być w stanie ocenić wszystkie naczynia z jednego badania w ciągu maksymalnie dwóch dni.

Ekstrakcja na mokro

Ekstrakcję na mokro należy rozpocząć natychmiast po zakończeniu badania. Glebę z każdego naczynia badawczego umieszcza się w sitach z tworzywa sztucznego o oczkach około 1 mm. Sita zawiesza się następnie w miskach z tworzywa sztucznego tak, aby nie dotykały dna. Miski ostrożnie napełnia się wodą, do momentu aż próbki w sitach znajdą się całkowicie pod powierzchnią wody. Aby zapewnić współczynnik odzysku powyżej 90 % obecnych organizmów, należy zastosować okres ekstrakcji wynoszący 3 dni przy temperaturze 20 ± 2 °C. Na koniec okresu ekstrakcji sita usuwa się, a wodę (poza niewielką ilość) powoli się dekantuje, uważając, aby nie naruszyć osadu na dnie naczyń. Następnie miski z tworzywa sztucznego wstrząsa się lekko, aby uzyskać zawiesinę osadu w wodzie nadosadowej. Wodę przelewa się do szalki Petriego i, po osadzeniu się cząstek gleby, można zidentyfikować wazonkowce, usunąć je i policzyć, używając w tym celu mikroskopu stereoskopowego i delikatnej stalowej pęsety.

Flotacja

Metoda oparta na flotacji jest opisana w nocie sporządzonej przez R. Kupermana (4). Po utrwaleniu zawartości naczynia badawczego etanolem glebę zalewa się Ludoxem (AM-30 krzemionka koloidalna, 30 % wag. zawiesiny w wodzie) do poziomu 10–15 mm powyżej powierzchni gleby. Po dokładnym wymieszaniu gleby z odczynnikami flotacyjnymi przez 2–3 minuty można łatwo policzyć młode organizmy unoszące się na powierzchni.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Korinkova J. i Sigmund J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke 32, 300–305.
- (2) Dirven-Van Breemen E., Baerselmann R. i 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 s.

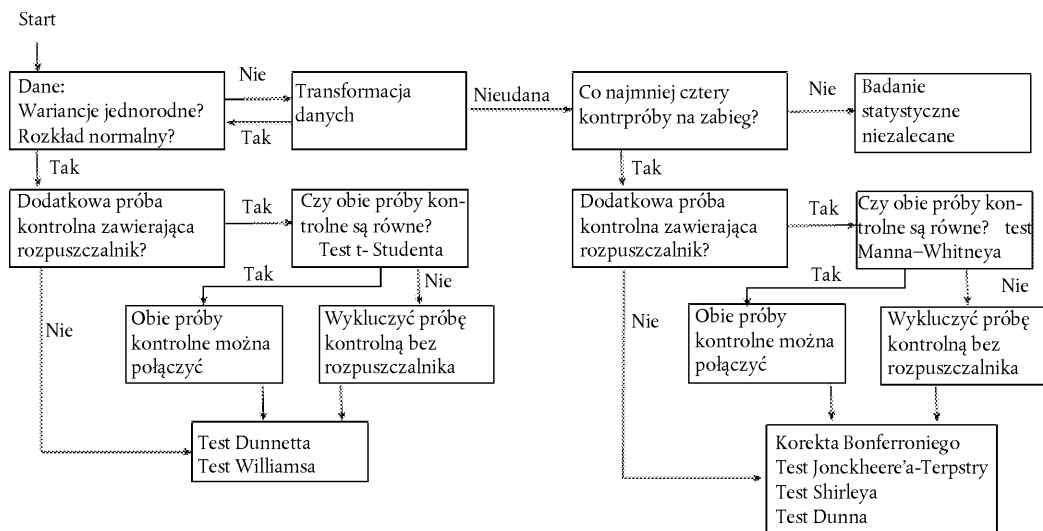
-
- (3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. i Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Envir. Safety* 38, 108–121.
- (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. i Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. 19. roczne posiedzenie SETAC, Charlotte, Stany Zjednoczone. Zbiór abstraktów nr PMP069, s. 157.
-

Dodatek 7

Przegląd statystycznej oceny danych (oznaczanie NOEC)

Testy parametryczne

Testy nieparametryczne



C.33. BADANIE ROZRODCZOŚCI DŹDŻOWNIC (*EISENIA FETIDA*/*EISENIA ANDREI*)**WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 222 (2004). Opracowana została w celu oceny wpływu działania substancji chemicznych na zdolność rozrodczą (i inne subletalne punkty końcowe) gatunków *Eisenia fetida* (Savigny 1826) lub *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). Przeprowadzono badanie międzylaboratoryjne (3). Istnieje metoda badania ostrej toksyczności dla dżdżownic (4). Opublikowano szereg innych międzynarodowych i krajowych wytycznych dotyczących badań ostrej i chronicznej toksyczności dla dżdżownic (5)(6)(7)(8).
2. *Eisenia fetida* / *Eisenia andrei* są uważane za gatunki należące do przedstawicieli fauny żyjącej w glebie, w szczególności dżdżownic. Dostępne są podstawowe informacje dotyczące ekologii dżdżownic i ich zastosowania w badaniach ekotoksykologicznych (7)(9)(10)(11)(12).

ZASADA BADANIA

3. Osobniki dorosłe poddaje się narażeniu na zakres stężeń badanej substancji chemicznej, która jest wymieszana z glebą albo, w przypadku pestycydów, wprowadzona do gleby lub na glebę z wykorzystaniem procedur zgodnych z wzorcem stosowania substancji chemicznej. Metoda wprowadzenia zależy od celu badania. Zakres badanych stężeń wybiera się tak, aby wybrać stężenia, które prawdopodobnie mogą wywołać subletalne i letalne skutki w okresie ośmiu tygodni. Śmiertelność i wpływ na wzrost osobników dorosłych określa się po 4 tygodniach narażenia. Osobniki dorosłe usuwa się następnie z gleby, a wpływ na rozrodczość ocenia po kolejnych 4 tygodniach, licząc potomstwo obecne w glebie. Zdolność rozrodczą zwierząt narażonych na badaną substancję chemiczną porównuje się z próbami kontrolnymi w celu określenia (i) stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub (ii) EC_x (np. EC_{10} , EC_{50}), stosując model regresji w celu oszacowania stężenia, które spowoduje zmniejszenie zdolności rozrodczej o x %. Badane stężenia powinny zawierać w swoim zakresie EC_x (np. EC_{10} , EC_{50}), aby EC_x wynikało raczej z interpolacji niż ekstrapolacji (definicje znajdują się w dodatku 1).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

4. Dostęp do następujących informacji związanych z badaną substancją chemiczną powinien ułatwić opracowanie właściwych procedur badawczych:
 - rozpuszczalność w wodzie;
 - $\log K_{ow}$;
 - prężność pary;
 - i, w miarę możliwości, informacje na temat losów i zachowania w środowisku (np. wskaźniki fotolizy i hydrolizy, jeżeli są właściwe dla wzorców zastosowania).
5. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do wszystkich substancji chemicznych, niezależnie od ich rozpuszczalności w wodzie. Metoda badawcza nie ma zastosowania do lotnych substancji chemicznych, które definiuje się tutaj jako substancje, w odniesieniu do których stała Henry'ego lub współczynnik podziału powietrze-woda są większe niż jeden, lub do substancji chemicznych z prężnością pary powyżej 0,0133 Pa w temperaturze 25 °C.
6. W niniejszej metodzie badawczej nie uwzględnia się możliwej degradacji badanej substancji chemicznej podczas okresu badania. W związku z tym nie można zakładać, że w czasie trwania badania zostaną utrzymane początkowe wartości stężeń ekspozycyjnych. W tym przypadku zaleca się analizę chemiczną badanej substancji chemicznej na początku i na końcu badania.

SUBSTANCJACHEMICZNA ODNIESIENIA

7. Należy określić EC_x lub NOEC substancji chemicznej odniesienia, aby zapewnić odpowiednie warunki badania w laboratorium i sprawdzić, czy reakcja organizmów użytych do badania nie zmieniła się w czasie. Wskazane jest badanie chemicznej substancji odniesienia co najmniej dwa razy do roku lub równoległe z określaniem toksyczności badanej substancji chemicznej, gdy badanie jest wykonywane z mniejszą częstotliwością. Karbendazym lub benomyl stanowią właściwe substancje chemiczne odniesienia, w przypadku których udowodniono wpływ na rozrodczość (3). Istotne skutki powinny być obserwowane między a) 1–5 mg substancji czynnej na kilogram suchej masy lub b) 250–500 g/ha lub 25–50 mg/m². Jeżeli badana seria obejmuje pozytywną normę toksyczną, stosuje się jedno stężenie i liczba kontrprób powinna być taka sama jak w przypadku prób kontrolnych.

WAŻNOŚĆ BADANIA

8. Aby wynik badania był ważny, powinny być spełnione następujące kryteria dotyczące prób kontrolnych:
- każda kontrpróba (zawierająca 10 osobników dorosłych) powinna wytworzyć ≥ 30 młodych osobników do zakończenia badania;
 - współczynnik zmienności rozrodczości powinien wynosić $\leq 30\%$;
 - śmiertelność osobników dorosłych przez pierwsze 4 tygodnie badania powinna wynosić $\leq 10\%$.

Jeżeli badanie nie spełni powyższych kryteriów ważności, należy je zakończyć, chyba że przedstawić można uzasadnienie kontynuacji badania. Uzasadnienie należy włączyć do sprawozdania.

OPIS BADANIA

Wypożyczenie

9. Należy zastosować pojemniki badawcze wykonane ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału o pojemności około jednego do dwóch litrów. Naczynia te powinny mieć pole przekroju poprzecznego około 200 cm², aby umożliwić uzyskanie 5–6 cm głębokości wilgotnego podłoża, gdy sucha masa dodanego substratu wynosi 500–600 g. Konstrukcja pojemnika powinna umożliwiać wymianę gazową między podłożem i atmosferą oraz dostęp do światła (np. dzięki perforowanej przezroczystej osłonie), równocześnie zapobiegając ucieczce osobników. Jeżeli ilość podłoża użytego w badaniu jest znacznie większa niż 500–600 g na pojemnik badawczy, liczbę organizmów należy proporcjonalnie zwiększyć.
10. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, w szczególności następujące urządzenia:
- suszarka szafkowa,
 - mikroskop stereoskopowy,
 - pehametr i fotometr,
 - odpowiednie dokładne wagi,
 - odpowiedni sprzęt do regulacji temperatury,
 - odpowiedni sprzęt do regulacji wilgotności (nie jest konieczny, jeżeli naczynia narażone na działanie substancji mają pokrywki),
 - inkubator lub małe pomieszczenie z regulacją temperatury,
 - pincety, haczyki lub ezy,
 - łaźnia wodna.

Przygotowanie sztucznej gleby

11. W niniejszym badaniu zastosowano sztuczną glebę (5)(7) o następującym składzie (w oparciu o masy suche, suszone do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C):
- 10 % torfu sfagowego (wartość pH możliwie najbardziej zbliżona do przedziału 5,5–6,0, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielonego, osuszonego do zmierzonej wilgotności);
 - 20 % glinki kaolinowej (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

- 0,3–1,0 % węgla wapnia (CaCO_3 , sproszkowanego, do analiz), aby otrzymać wyjściowe pH $6,0 \pm 0,5$;
- 70 % kwarcowego piasku suszonego na powietrzu (w zależności od potrzebnej ilości CaCO_3), głównie drobnego piasku, w którym ponad 50 % cząstek ma wymiary 50–200 mikronów.

Uwaga 1: Ilość potrzebnego CaCO_3 będzie zależna od składników podłoża glebowego, w tym pokarmu, i należy ją oznaczyć, dokonując bezpośrednio przed badaniem pomiaru pH próbek gleby. pH mierzy się w zmieszanej próbce 1-molowego roztworu chlorku potasu (KCl) lub 0,01-molowego roztworu chlorku wapnia (CaCl_2) (13).

Uwaga 2: Zawartość węgla organicznego w sztucznej glebie można zredukować, np. zmniejszając zawartość torfu do 4–5 % i odpowiednio zwiększając zawartość piasku. Dzięki takiemu zmniejszeniu zawartości węgla organicznego mogą zmniejszyć się możliwości adsorpcji badanej substancji chemicznej do gleby (węgiel organiczny), a dostępność badanej substancji chemicznej dla organizmów może wzrosnąć. Wykazano, że gatunek *Eisenia fetida* może spełniać kryteria ważności dotyczące rozrodczości, jeśli bada się go w glebach naturalnych o niższej zawartości węgla organicznego (np. 2,7 %) (14); istnieją także doświadczenia pokazujące, że pozwala na to również zastosowanie sztucznej gleby przy zawartości torfu na poziomie 5 %. Dlatego też przed zastosowaniem takiej gleby w badaniu ostatecznym nie ma konieczności wykazania, że sztuczna gleba może umożliwić spełnienie kryteriów ważności badania, pod warunkiem że zawartość torfu nie zostanie zmniejszona poniżej poziomu określonego powyżej.

Uwaga 3: W przypadku zastosowania gleby naturalnej w dodatkowych badaniach (np. wyższego rzędu) należy również określić przydatność gleby i stosowność w odniesieniu do spełnienia kryteriów ważności.

12. Suche składniki gleby dokładnie miesza się (np. w dużym mieszalniku laboratoryjnym) w dobrze wentylowanym pomieszczeniu. Przed rozpoczęciem badania suchą sztuczną glebę nawilża się wstępnie, dodając odpowiednią ilość wody dejonizowanej w celu uzyskania około połowy końcowej zawartości wody, stanowiącej 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby (co odpowiada suchej masie o wilgotności 50 ± 10 %). W rezultacie powstanie podłoże, które nie zawiera wody stojącej ani niezwiązanej wody w przypadku ściśnięcia w dłoni. Maksymalną pojemność wodną sztucznej gleby określa się zgodnie z procedurami określonymi w dodatku 2, normie ISO 11274 (15) albo równoważnej normie UE.
13. Jeżeli badaną substancję chemiczną stosuje się na powierzchni gleby lub miesza się z glebą bez wody, ostateczną ilość wody można wmixować do sztucznej gleby podczas przygotowania gleby. Jeżeli badaną substancję chemiczną miesza się z glebą z pewną ilością wody, dodatkową wodę można dodać wraz z badaną substancją chemiczną (zob. pkt 19).
14. Zawartość wilgoci w glebie oznacza się na początku i na końcu badania, zgodnie z normą ISO 11465 (16) lub równoważną normą UE, zaś pH gleby określa się zgodnie z dodatkiem 3 lub normą ISO 10390 (13) lub równoważną normą UE. Oznaczenia te należy przeprowadzać w próbce gleby kontrolnej i próbce każdej gleby z badanym stężeniem. Nie należy korygować pH gleby podczas badania kwasowych substancji chemicznych lub podstawowych chemikaliów. Podczas badania należy monitorować zawartość wilgoci, co jakiś czas ważąc pojemniki (zob. pkt 26 i 30).

Wybór i przygotowanie zwierząt użytych do badania

15. Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu jest *Eisenia fetida* lub *Eisenia andrei* (1)(2). Do rozpoczęcia badania potrzebne są osobniki dorosłe w wieku od dwóch miesięcy do roku, posiadające siodełko. Organizmy należy wybrać z zsynchronizowanej hodowli o stosunkowo jednorodnej strukturze wiekowej (dodatek 4). Różnice wieku między osobnikami w badanej grupie nie powinny przekraczać 4 tygodni.
16. Wybrane organizmy należy aklimatyzować przez co najmniej jeden dzień w sztucznym podłożu glebowym, które ma być zastosowane w badaniu. W tym czasie organizmy należy karmić tym samym pokarmem, który zostanie zastosowany w badaniu (zob. pkt 31–33).
17. Należy oddzielnie ważyć grupy 10 organizmów, przypisując grupy losowo do pojemników badawczych na początku badania. Przed zważeniem osobniki wyjęte z gleby należy przemyć (wodą dejonizowaną) i nadmiar wody usunąć, umieszczając osobniki na chwilę na bibule filtracyjnej. Mokra masa pojedynczych organizmów powinna wynosić 250–600 mg.

Przygotowywanie badanych stężeń

18. Można zastosować dwie metody podania badanej substancji chemicznej: wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą (zob. pkt 19–21) albo nałożenie na powierzchnię gleby (zob. pkt 22–24). Wybór odpowiedniej metody zależy od celu badania. Zwykle zaleca się wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą. Mogą być jednak wymagane procedury stosowania, które są zgodne ze zwykłą praktyką rolniczą (np. opryskiwanie płynną postacią lub zastosowanie specjalnych postaci pestycydów, takich jak granulki lub zaprawy do nasion). Rozpuszczalniki zastosowane w celu ułatwienia podania badanej substancji chemicznej do gleby należy wybrać na podstawie ich niskiej toksyczności dla dżdżownic; w projekcie badania należy przewidzieć odpowiednią próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem (zob. pkt 27).

Wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą

Badana substancja chemiczna rozpuszczalna w wodzie

19. Roztwór badanej substancji chemicznej przygotowuje się bezpośrednio przed rozpoczęciem badania w wodzie dejonizowanej w ilości wystarczającej do wszystkich kontrprób w ramach jednego stężenia. Aby ułatwić przygotowanie roztworu do badań, wymagane może być zastosowanie rozpuszczalnika obojętnego. Wygodnie jest przygotować ilość roztworu niezbędną do osiągnięcia ostatecznej zawartości wilgoci (40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby). Roztwór miesza się dokładnie z podłożem glebowym przed wprowadzeniem go do pojemnika badawczego.

Badana substancja chemiczna nierozpuszczalna w wodzie

20. Badaną substancję chemiczną rozpuszcza się w niewielkiej ilości odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego (np. acetonu), a następnie rozpryskuje na niewielkiej ilości piasku kwarcowego albo miesza z tym piaskiem. Rozpuszczalnik usuwa się potem, odparowując go przez co najmniej kilka minut pod okapem wyciągowym. Przygotowany piasek miesza się następnie dokładnie ze wstępnie nawilżoną sztuczną glebą. Następnie dodaje się wodę dejonizowaną (w wymaganej ilości), aby osiągnąć ostateczną zawartość wilgoci na poziomie 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby, i miesza się ją z glebą. Tak przygotowaną glebę można przełożyć do pojemników badawczych. Należy zachować ostrożność, ponieważ niektóre rozpuszczalniki mogą być toksyczne dla dżdżownic.

Badana substancja chemiczna nierozpuszczalna w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych

21. Przygotowuje się mieszaninę zawierającą 10 g drobno zmielonego przemysłowego piasku kwarcowego i taką ilość badanej substancji chemicznej, jaka jest konieczna do osiągnięcia badanego stężenia w glebie. Otrzymaną mieszaninę miesza się następnie dokładnie ze wstępnie nawilżoną sztuczną glebą. Następnie dodaje się wodę dejonizowaną w ilości wymaganej do tego, by osiągnąć ostateczną zawartość wilgoci na poziomie 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby, i miesza się ją z glebą. Tak przygotowaną glebę można przełożyć do pojemników badawczych.

Zastosowanie badanej substancji chemicznej na powierzchni gleby

22. Glebę poddaje się działaniu substancji chemicznej po wprowadzeniu do gleby organizmów. Najpierw napełnia się pojemniki badawcze nawilżonym podłożem glebowym, a następnie umieszcza się na powierzchni podłoża zważone organizmy. Zdrowe organizmy zwykle natychmiast zakopują się w podłożu, w związku z czym organizmy, które zostaną na powierzchni po 15 minutach, uznaje się za uszkodzone i należy je wymienić. W przypadku wymiany organizmy nowe i organizmy wymieniane należy zważyć, tak aby była znana całkowita masa w relacji pełnej grupy organizmów narażonych na działanie substancji oraz całkowita waga pojemnika z organizmami na początku badania.
23. Podaje się badaną substancję chemiczną. Nie należy dodawać jej do gleby w ciągu pół godziny od wprowadzenia do niej organizmów (lub jeżeli organizmy znajdują się na powierzchni gleby), aby uniknąć bezpośredniego narażenia na badaną substancję chemiczną przez kontakt ze skórą. Jeżeli substancja chemiczna jest pestycydem, właściwe może być zastosowanie jej na powierzchni gleby przez rozpylenie. Badaną substancję chemiczną należy rozprowadzić na powierzchni gleby jak najrównomierniej, korzystając z odpowiednich laboratoryjnych urządzeń rozpylających symulujących opryski w terenie. Przed zastosowaniem badanej substancji chemicznej należy zdjąć pokrywę pojemnika badawczego i zastąpić ją wkładką, która ochroni ścianki boczne pojemnika przed opryskaniem. Wkładkę można wykonać z pojemnika badawczego, z którego usunięto dno. Substancję należy podać w temperaturze 20 ± 2 °C, a w przypadku roztworów wodnych, emulsji lub zawiesin dawka podawanej wody powinna wynosić 600–800 ml/m². Dawkę należy zweryfikować za pomocą odpowiedniej techniki kalibracji. Szczególne postacie, takie jak granulki lub zaprawy do nasion, należy stosować w sposób zgodny z praktyką rolniczą.

24. Pojemniki badawcze należy pozostawić bez przykrycia na jedną godzinę, aby umożliwić odparowanie lotnego rozpuszczalnika związanego z zastosowaniem badanej substancji chemicznej. Należy uważać, aby żaden organizm nie uciekł w tym czasie z naczynia badawczego.

PROCEDURA

Grupy badane i kontrolne

25. Zaleca się wprowadzenie 10 organizmów na 500–600 g suchej masy sztucznej gleby (tj. 50–60 g gleby na organizm). Jeżeli stosuje się większe ilości gleby, co może mieć miejsce podczas badania pestycydów o szczególnych trybach zastosowania, takich jak zaprawy do nasion, należy utrzymać zawartość 50–60 g gleby na organizm, zwiększając liczbę organizmów. Na każdy pojemnik z próbą kontrolną i próbą poddaną zabiegowi przygotowuje się po dziesięć organizmów. Organizmy przemycza się wodą i wyciera, a następnie umieszcza się na chłonnym papierze na krótki czas, aby umożliwić wyschnięcie nadmiaru wody.
26. Aby zapobiec systematycznym błędom w rozmieszczaniu organizmów w pojemnikach badawczych, należy określić jednorodność badanej populacji przez osobne zważenie 20 organizmów pobranych losowo z populacji, z której pobrane zostaną organizmy badane. Po zapewnieniu jednorodności należy wybrać partie organizmów, zważyć je i przyporządkować do pojemników badawczych, stosując procedurę randomizacji. Po dodaniu organizmów badanych należy określić masę każdego pojemnika badawczego, aby ustalić wagę początkową, którą można wykorzystać jako podstawę monitorowania zawartości wilgoci w glebie podczas trwania badania, jak opisano w pkt 30. Pojemniki badawcze następnie przykrywa się zgodnie z opisem w pkt 9 i umieszcza w komorze badawczej.
27. W przypadku każdej z metod wprowadzenia badanej substancji chemicznej opisanych w pkt 18–24 przygotowuje się odpowiednie próby kontrolne. Podczas przygotowywania prób kontrolnych postępuje się zgodnie z odpowiednimi opisanymi procedurami, z tym, że nie dodaje się badanej substancji chemicznej. W związku z tym, w stosownych przypadkach w próbach kontrolnych stosuje się rozpuszczalniki organiczne, piasek kwarcowy lub inne nośniki, w stężeniach/ilościach odpowiednich do tych, które zastosowano podczas zabiegów. W przypadku gdy do dodania badanej substancji chemicznej wykorzystuje się rozpuszczalnik lub inny nośnik, należy również przygotować dodatkową próbę kontrolną bez nośnika lub badanej substancji chemicznej i zbadać ją w celu upewnienia się, że nośnik nie ma wpływu na wynik.

Warunki badania

28. Badanie przeprowadza się w temperaturze 20 ± 2 °C. Badanie przeprowadza się w warunkach kontrolowanych cykli światło–ciemność (najlepiej 16 godzin światła i 8 godzin bez dostępu światła) z natężeniem światła na obszarze, w którym znajdują się pojemniki badawcze, na poziomie 400–800 luksów.
29. Pojemników badawczych nie napowietrza się podczas badania, jednak konstrukcja pokryw naczyń badawczych powinna umożliwiać wymianę gazową, a jednocześnie ograniczać parowanie wilgoci (zob. pkt 9).
30. Zawartość wody w podłożu glebowym w pojemnikach badawczych utrzymywana jest podczas trwania badania przez ponowne ważenie pojemników badawczych (odejmując ich pokrywy) co jakiś czas. W razie potrzeby straty uzupełnia się wodą dejonizowaną. Zawartość wody nie powinna różnić się od zawartości wody na początku badania o więcej niż 10 %.

Karmienie

31. Każdy pokarm, którego jakość okazała się odpowiednia co najmniej do utrzymania masy organizmów podczas badania uważa się za dopuszczalny. Doświadczenie pokazuje, że odpowiednim pokarmem jest mąka owsiana lub obornik krowi lub koński. Należy kontrolować, czy krowom lub koniom, od których pozyskiwany jest obornik, nie podaje się leków ani substancji chemicznych, takich jak stymulatory wzrostu, nematocydy, lub podobnych produktów weterynaryjnych, które mogłyby negatywnie wpłynąć na organizmy w trakcie badania. Zaleca się samodzielnie zbierać obornik krowi, ponieważ doświadczenie pokazało, że obornik krowi dostępny na rynku jako nawóz ogrodowy może mieć niekorzystny wpływ na organizmy. Obornik powinien być suszony powietrzem, drobno zmielony i pasteryzowany przed użyciem.
32. Każdą świeżą partię pokarmu należy podać hodowli organizmów niepoddanej badaniu zanim zostanie użyta w badaniu, aby mieć pewność, że jej jakość jest odpowiednia. Wzrost i wytwarzanie kokonów nie powinny być zmniejszone w porównaniu do organizmów trzymanych w podłożu, które nie zawiera nowej partii pokarmu (warunki opisane w metodzie badawczej C.8(4)).

33. Pokarm podaje się po raz pierwszy jeden dzień po dodaniu organizmów i zastosowaniu badanej substancji chemicznej w glebie. Na powierzchni gleby w każdym zbiorniku rozprowadza się około 5 g pokarmu, a następnie nawilża się go wodą dejonizowaną (około 5–6 ml na zbiornik). Następnie pokarm podaje się raz na tydzień podczas 4-tygodniowego okresu badania. Jeżeli pokarm pozostanie niezjedzony, dawkę należy zmniejszyć, aby zapobiec rozwojowi grzybów lub pleśnieniu. Osobniki dorosłe usuwa się z gleby w 28. dniu badania. Następnie podaje się kolejne 5 g pokarmu do każdego pojemnika badawczego. Podczas pozostałych 4 tygodni badania nie następuje już karmienie.

Dobór badanych stężeń

34. W doborze odpowiednich badanych stężeń pomocna powinna być uprzednia znajomość toksyczności badanej substancji chemicznej np. z badania ostrej toksyczności (4) lub z badań ustalających zakres. W stosownych przypadkach przeprowadza się badanie ustalające zakres, stosując np. pięć badanych stężeń wynoszących 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg (suchej masy gleby). Jedna kontrpróba dla każdej grupy badanej i kontrolnej jest wystarczająca. Badanie ustalające zakres trwa dwa tygodnie i po jego zakończeniu ocenia się śmiertelność.

Projekt doświadczenia

35. Ponieważ nie jest możliwe wskazanie jednego sumarycznego wskaźnika dla tego badania, w niniejszej metodzie badawczej przewiduje się wyznaczanie NOEC i EC_x. NOEC będzie najprawdopodobniej wymagane przez organy regulacyjne w przewidywanej przyszłości. W niedalekiej przyszłości stosowanie EC_x może stać się powszechniejsze ze względów statystycznych i ekologicznych. Dlatego też proponowane są trzy układy w oparciu o zalecenia wynikające z badania międzylaboratoryjnego w ramach metody badawczej dotyczącej rozmnażania wazonkowcowatych (17)
36. Przy ustalaniu zakresu stężeń należy wziąć pod uwagę, co następuje:
- w celu wyznaczenia NOEC należy zbadać co najmniej pięć/dwanaście stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego badanego stężenia i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 2,0-krotność poprzedniego;
 - w celu wyznaczenia EC_x (np. EC10, EC50) zaleca się stosowanie odpowiedniej liczby stężeń, tak aby uzyskać co najmniej cztery statystycznie istotnie różne średnie reakcje przy tych stężeniach. Zaleca się co najmniej dwie kontrpróby dla każdego badanego stężenia oraz sześć kontrprób kontrolnych. Współczynnik rozstawienia stężeń może być zróżnicowany, tj. może być równy lub mniejszy niż 1,8 w oczekiwanym przedziale skutków oraz może przekraczać 1,8 przy wyższych i niższych stężeniach;
 - połączone podejście umożliwia wyznaczenie zarówno NOEC, jak i EC_x. Należy zastosować osiem badanych stężeń uporządkowanych w szeregu geometrycznym. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego zabiegu i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 1,8-krotność poprzedniego;

Czas trwania badania i pomiary

37. W 28. dniu żyjące osobniki dorosłe poddaje się obserwacji i liczy. Odnotowuje się również wszelkie nietypowe zachowania (np. niezdolność zakopywania się w glebie; leżenie w bezruchu) oraz zmiany w morfologii (np. otwarte rany). Następnie wszystkie osobniki dorosłe usuwa się z naczyń badawczych oraz liczy i waży. Przeniesienie gleby zawierającej organizmy na czystą tacę przed oceną może ułatwić poszukiwanie osobników dorosłych. Przed zważeniem osobniki wyjęte z gleby należy przemyć (wodą dejonizowaną) i nadmiar wody usunąć, umieszczając osobniki na chwilę na bibule filtracyjnej. Osobniki, których nie znaleziono na tym etapie, odnotowuje się jako martwe, ponieważ zakłada się, że osobniki takie padły i rozłożyły się przed oceną.
38. Jeżeli z pojemników wyjęto glebę, należy ją następnie z powrotem włożyć do pojemników (bez osobników dorosłych, ale z ewentualnymi kokonami, które mogły zostać wytworzone). Następnie glebę inkubuje się przez dodatkowo cztery tygodnie w tych samych warunkach badania, z tym, że karmienie odbywa się dopiero po rozpoczęciu tej fazy badania (zob. pkt 33).

39. Po upływie drugiego 4-tygodniowego okresu ustala się liczbę młodych, które wykluły się z kokonów w glebie służącej do badania, oraz liczbę kokonów z zastosowaniem procedur opisanych w dodatku 5. W całym okresie badania należy również odnotowywać wszelkie oznaki uszkodzeń osobników.

Badanie graniczne

40. Jeżeli w badaniu ustalającym zakres nie zaobserwowano żadnych efektów przy najwyższym stężeniu (tj. 1 000 mg/kg), jako badanie graniczne można przeprowadzić badanie rozrodczości, stosując badane stężenie wynoszące 1 000 mg/kg. Badanie graniczne zapewni możliwość wykazania, że NOEC w przypadku rozrodczości jest wyższe niż stężenie graniczne, przy czym do badania używa się minimalnej liczby osobników. Należy zastosować osiem kontrprób zarówno w odniesieniu do gleby podanej zabiegowi, jak i próby kontrolnej.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

41. Oprócz przeglądu zamieszczonego w dodatku 6 w ramach niniejszej metody badawczej nie podaje się żadnych definitywnych wytycznych statystycznych na potrzeby analizy wyników badania.
42. Jednym z punktów końcowych jest śmiertelność. Należy jednak odnotować również wszelkie zmiany w zachowaniu (np. niezdolność zakopywania się w glebie; leżenie w bezruchu przy szklanej ścianie naczynia badawczego) i w morfologii (np. otwarte rany) osobników dorosłych, jak również ewentualne występowanie młodych. W celu wyznaczenia LC_{50} zwykle stosuje się analizę probitową (18) albo regresję logistyczną. Niemniej w przypadkach, w których ta metoda analizy jest nieodpowiednia (np. jeśli dostępne są mniej niż trzy stężenia, które doprowadziły do częściowej śmiertelności), można zastosować alternatywne metody. Wspomniane metody mogą obejmować średnie kroczące (19), uproszczoną metodę Spearmana-Kärbera (20) albo prostą interpolację (np. średnia geometryczna LC_0 i LC_{100} , obliczona jako pierwiastek kwadratowy LC_0 pomnożony przez LC_{100}).
43. Innym punktem końcowym jest płodność (tj. liczba wykłutych młodych). Podobnie jak w przypadku badania ustalającego zakres wszystkie pozostałe objawy szkodliwości należy jednak również odnotować w sprawozdaniu końcowym. Do celów analizy statystycznej dotyczącej rozrodczości wymagane jest obliczenie średniej arytmetycznej $\bar{x}$ oraz odchylenia standardowego w odniesieniu do grupy badanej i grupy kontrolnej.
44. Jeżeli przeprowadzono analizę wariancji, odchylenie standardowe (s) i stopnie swobody (df) można zastąpić połączonym oszacowaniem wariancji uzyskanym z analizy wariancji i jego stopniem swobody odpowiednio, pod warunkiem że wariancja nie jest uzależniona od stężenia. W takim przypadku należy zastosować pojedyncze wariancje grupy kontrolnej i grup badanych. Wartości te oblicza się zwykle za pomocą dostępnego na rynku oprogramowania statystycznego, stosując wyniki uzyskane w odniesieniu do naczynia jako kontrpróby. Jeżeli zasadne wydaje się łączenie danych na potrzeby prób kontrolnych negatywnych i prób kontrolnych z rozpuszczalnikami zamiast badania pod kątem jednej z nich, należy zbadać te dane, aby sprawdzić, czy nie są one wyraźnie odmienne (w celu ustalenia odpowiedniego badania należy zapoznać się z pkt 47 i dodatkiem 6).
45. Dalsze badanie i wnioskowanie statystyczne jest uzależnione od tego, czy wartości kontrpróby są normalnie rozłożone i jednorodne w odniesieniu do ich wariancji.

Oszacowanie NOEC

46. Preferowane powinno być stosowanie silnych testów. Należy korzystać z informacji np. wynikających z wcześniejszych doświadczeń z badaniami międzylaboratoryjnymi lub z innych danych historycznych dotyczących tego, czy dane są w przybliżeniu normalnie rozłożone. Istotniejsza jest jednorodność wariancji (homoskedastyczność). Jak pokazuje doświadczenie, wariancja często wzrasta wraz z rosnącą średnią. W takich przypadkach transformacja danych może doprowadzić do homoskedastyczności. Transformacja taka powinna się jednak raczej opierać na doświadczeniu związanym z historycznymi danymi niż na danych będących przedmiotem analizy. W przypadku danych jednorodnych należy przeprowadzić wielokrotne testy t-Studenta, takie jak test Williamsa ($\alpha = 0,05$, jednostronny) (21)(22) albo w niektórych przypadkach test Dunnetta (23) (24). Należy zaznaczyć, że w przypadku nierównej replikacji wartości (t) z tabeli trzeba skorygować, jak sugerują Dunnett i Williams. Niekiedy ze względu na dużą wariancję reakcje nie wzrastają/zmniejszają się regularnie. W takim przypadku dużego odchylenia od monotoniczności bardziej odpowiedni jest test Dunnetta. Jeżeli występują odchylenia od homoskedastyczności, zasadne może być dokładniejsze zbadanie możliwego wpływu na wariancję w celu ustalenia, czy można zastosować testy t-Studenta bez zbytej utraty mocy statystycznej (25). Ewentualnie można zastosować wielokrotny test Manna-Whitneya, np. test Manna-Whitneya

z korektą Bonferroniego według Holma (26), albo test nieparametryczny [np. test Jonckheere'a (27)(28) lub Shirleya (29) (30)] w przypadku gdy dane te przejawiają heteroskedastyczność, ale poza tym są spójne z podstawową monotoniczną zależnością dawka-odpowiedź, i zasadniczo testy te są preferowane w stosunku do testów t-Studenta dla nierównych wariancji (zob. również schemat w dodatku 6).

47. Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne i warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur testów (normalność, jednorodność) są spełnione, można zastosować test t-Studenta w parach albo procedurę testu Manna-Whitneya (31).

Oszacowanie EC_x

48. W celu obliczenia dowolnej wartości EC_x po uzyskaniu odpowiedniej funkcji dawka-odpowiedź wykorzystuje się średnie z poszczególnych zabiegów do analizy regresji (liniowej albo nieliniowej). W odniesieniu do wzrostu osobników jako reakcji ciągłej wartości EC_x można oszacować, stosując odpowiednią analizę regresji (32). Wśród odpowiednich funkcji dla danych binarnych (śmiertelność/przeżycie) oraz liczby potomstwa znajdują się normalne funkcje: sigmoidalna, logistyczna lub Weibulla, zawierające dwa do czterech parametrów, z których część może również modelować reakcje hormetyczne. Jeżeli funkcję dawka-odpowiedź dopasowano za pomocą analizy regresji liniowej, przed oszacowaniem EC_x należy ustalić wysokie r^2 (współczynnik determinacji) lub nachylenie za pomocą analizy regresji, wstawiając wartość odpowiadającą x % średniej wartości próby kontrolnej do równania otrzymanego w wyniku analizy regresji. Granice ufności na poziomie 95 % oblicza się zgodnie z metodą Fiellera (przytoczoną przez Finneya (18)) lub innymi odpowiednimi współczesnymi metodami.
49. Ewentualnie reakcję modeluje się jako odsetek lub proporcję modelowego parametru, który interpretuje się jako średnią reakcję próby kontrolnej. W takich przypadkach normalną krzywą sigmoidalną (logistyczną, Weibulla) można często z łatwością dopasować do wyników, wykorzystując procedurę regresji probitowej (18). W takich przypadkach funkcję wagi trzeba dostosować na potrzeby odpowiedzi metrycznych, jak podaje Christensen (33). Jeżeli jednak zaobserwowano hormezę, analizę probitową należy zastąpić czteroparametrową funkcją logistyczną lub Weibulla, dopasowaną za pomocą procedury regresji nieliniowej (34). Jeżeli dopasowanie odpowiedniej funkcji dawka-odpowiedź do danych nie jest możliwe, wówczas do oszacowania EC_x i jego granic ufności można zastosować alternatywne metody, takie jak średnie kroczące za Thompsonem (19) i uproszczona procedura Spearmana-Kärbera (20).

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

50. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje.

Badana substancja chemiczna:

- szczegółowy opis badanej substancji chemicznej, partia, seria i numer CAS, stopień czystości;
- właściwości badanej substancji chemicznej (np. log Kow, rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, stała Henry'ego (H) i informacje o losach i zachowaniu się).

Organizmy użyte do badania:

- zwierzęta użyte do badania: gatunek, nazwa systematyczna, źródło organizmów i warunki hodowli;
- wiek, przedział wielkości (masy) organizmów użytych do badania.

Warunki badania

- szczegóły przygotowania gleby do badania;
- maksymalna pojemność wodna gleby;
- opis techniki stosowanej do wprowadzenia badanej substancji chemicznej do gleby;
- szczegółowe dane dotyczące pomocniczych substancji chemicznych użytych w celu podania badanej substancji chemicznej;
- w stosownych przypadkach szczegółowe dane dotyczące kalibracji urządzenia rozpylającego;
- opis projektu doświadczenia i procedury;
- wielkość pojemników badawczych oraz objętość gleby do badań;
- natężenie światła, czas trwania cykli światło-brak światła, temperatura;

- opis schematu żywienia, rodzaj i ilość pokarmu używanego w badaniu, terminy karmienia;
- pH i zawartość wody w glebie na początku i na końcu badania.

Wyniki badania:

- śmiertelność osobników dorosłych (%) w każdym pojemniku badawczym po zakończeniu pierwszych 4 tygodni badania;
- całkowita masa osobników dorosłych na początku badania w każdym pojemniku badawczym;
- zmiany masy ciała żywych osobników dorosłych (% masy wyjściowej) w każdym pojemniku badawczym po pierwszych czterech tygodniach badania;
- liczba osobników młodych wyklutych w każdym pojemniku badawczym na końcu badania;
- opis wyraźnych symptomów fizjologicznych lub patologicznych lub widocznych zmian w zachowaniu;
- wyniki otrzymane z wykorzystaniem badanej substancji chemicznej odniesienia;
- wartości LC_{50} , NOEC lub EC_x (np. EC_{50} , EC_{10}) w odniesieniu do rozrodczości, jeżeli niektóre z nich mają zastosowanie z przedziałami ufności oraz wykres dopasowanego modelu użyty do ich obliczenia, wszystkie informacje i obserwacje pomocne w interpretacji wyników;
- wykres zależności dawka-odpowiedź;
- wyniki mające zastosowanie do każdego pojemnika badawczego.

Odchylenia od procedur opisanych w niniejszej metodzie badawczej oraz wszelkie nietypowe zdarzenia, jakie miały miejsce podczas badania.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Jaenicke, J. (1982). *Eisenia foetida* is two biological species. Megadrilogica 4, 6–8.
- (2) Oien, N. i 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. W: 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- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem, 320, s. 50–82.
- (4) Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Dżdżownica, badanie toksyczności ostrej.
- (5) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, nr 11268-2. ISO, Genewa.
- (6) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Genewa.
- (7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., i L. Posthuma, (red.). SETAC Press, 456 s.
- (8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (US EPA). Urząd ds. Zapobiegania, Pestycydów i Substancji Toksycznych. EPA712-C-96-167, kwiecień 1996 r.
- (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. Raport EUR 8714 EN, Komisja Wspólnot Europejskich.
- (11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards i F. Heimbach (red.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

- (12) Edwards, C.A. i J. P. Bohlen, (1996). *Biology and ecology of Earthworms*, wydanie 3. Chapman and Hall, Londyn.
- (13) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). *Soil Quality – Determination of pH*, nr 10390. ISO, Genewa.
- (14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. i Achazi R. (2000): *Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests*. W: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden S., Erb R., Dott W. i Eisentraeger A. (red.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59–81.
- (15) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1992). *Soil Quality – Determination of water retention characteristics – Laboratory methods*, nr 11274. ISO, Genewa.
- (16) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1993). *Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method*, nr 11465. ISO, Genewa.
- (17) Römbke, J. i Th. Moser (1999). *Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test*. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 s.
- (18) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (wydanie 3.), s. 19–76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. – Charles Griffin & Company Ltd, Londyn.
- (20) Hamilton M.A., R.C. Russo i R.V. Thurston. (1977). *Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays*. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714–719; *Correction Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (21) Williams, D.A., (1971). *A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control*. *Biometrics* 27, 103–117.
- (22) Williams, D.A., (1972). *The comparison of several dose levels with a zero dose control*. *Biometrics* 28, 519–531.
- (23) Dunnett C.W., (1955). *A multiple 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. i F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research*. Wydanie 2. W.H. Freeman and Company. Nowy Jork.
- (32) Bruce R.D. i 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. i J.A. Hoekstra. (1993). *Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present*. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25–32.

Dodatek 1

Definicje

Następujące definicje mają zastosowanie do niniejszej metody badawczej.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

EC_x (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływu na organizmy użyte do badania w danym okresie narażenia, w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC₅₀ jest stężeniem, które w przybliżeniu ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia. W niniejszym badaniu wszystkie stężenia efektywne wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby lub jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na jednostkę powierzchni gleby.

LC₀ (stężenie niepowodujące skutków śmiertelnych) to stężenie badanej substancji chemicznej, które nie prowadzi do śmierci żadnego z organizmów użytych do badania, narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC₀ wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LC₅₀ (mediana stężenia śmiertelnego) to stężenie badanej substancji chemicznej, które prowadzi do śmierci 50 % organizmów użytych do badania narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC₅₀ wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby lub jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na jednostkę powierzchni gleby.

LC₁₀₀ (stężenie całkowicie śmiertelne) to stężenie badanej substancji chemicznej, które prowadzi do śmierci 100 % organizmów użytych do badania, narażonych na działanie tej substancji przez określony czas. W niniejszym badaniu LC₁₀₀ wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby.

LOEC (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany) oznacza najniższe stężenie badanej substancji chemicznej mające statystycznie istotny skutek ($p < 0,05$). W niniejszym badaniu LOEC wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby lub jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na jednostkę powierzchni gleby. Wszystkie badane stężenia wyższe niż LOEC powinny normalnie wykazywać skutek, który różni się statystycznie od próby kontrolnej. Wszelkie odchylenia od powyższego muszą zostać uzasadnione w sprawozdaniu z badania.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej bezpośrednio poniżej LOEC, przy którym nie obserwuje się żadnych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego skutku ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia, jeżeli porówna się je z próbą kontrolną.

Wskaźnik rozrodczości oznacza średnią liczbę młodych organizmów na określoną liczbę osobników dorosłych w czasie trwania badania.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Określenie maksymalnej pojemności wodnej gleby

Jak wykazano, do określania maksymalnej pojemności wodnej gleby (WHC) odpowiednia jest następująca metoda. Została ona opisana w załączniku C do normy ISO DIS 11268-2 (1).

Pobrać do badania określoną ilość (np. 5 g) gleby z podłoża za pomocą odpowiedniego przyrządu (wybieraka ślimakowego itp.). Przykryć dno wybieraka kawałkiem bibuły filtracyjnej, a następnie, po napełnieniu wodą, umieścić wybierak na stelażu w łaźni wodnej. Wybierak należy stopniowo zanurzać aż do momentu, gdy poziom wody znajdzie się powyżej powierzchni gleby. Następnie należy zostawić go w wodzie na około trzy godziny. Ponieważ nie cała woda wchłonięta przez kapilary w glebie może zostać zatrzymana, należy umieścić wybierak na podłożu z wilgotnego drobno zmielonego piasku kwarcowego umieszczonego w przykrytym naczyniu (aby zapobiec wysychaniu) na dwie godziny w celu odsączenia próbki gleby. Próbkę należy następnie zważyć, wysuszyć do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C. Pojemność wodną gleby (WHC) można następnie obliczyć w następujący sposób:

$$\text{WHC (w \% suchej masy)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdzie:

S = podłoże nasycone wodą + masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej

T = tara (masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej)

D = sucha masa podłoża

BIBLIOGRAFIA:

- 1) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, nr 11268-2. ISO, Genewa.

Dodatek 3

Określenie pH gleby

Podana poniżej metoda określania pH gleby opiera się na opisie zawartym w normie ISO DIS 10390: Jakość gleby – Oznaczanie pH (1).

Określoną ilość gleby suszy się w temperaturze pokojowej przez co najmniej 12 godzin. Następnie sporządzana jest zawiesina gleby (zawierająca co najmniej 5 gramów gleby) w 1-molowym roztworze chlorku potasu czystym do analizy (KCl) lub 0,01-molowym roztworze chlorku wapnia czystym do analizy (CaCl₂) o objętości pięciokrotnie większej od objętości gleby. Otrzymaną zawiesinę dokładnie wymieszać, wstrząsając przez pięć minut, a następnie odstawić do osadzenia się na co najmniej 2 godziny, ale nie na dłużej niż 24 godziny. W fazie ciekłej pH jest mierzone za pomocą pehametru, który jest kalibrowany przed każdym pomiarem przy użyciu odpowiedniego szeregu roztworów buforowych (np. pH 4,0 i 7,0).

BIBLIOGRAFIA:

- 1) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Determination of pH, nr 10390. ISO, Genewa.

Dodatek 4

Hodowla *Eisenia fetida*/Eisenia andrei

Zaleca się prowadzenie hodowli w komorze klimatycznej w $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. W tej temperaturze i przy zapewnieniu wystarczającej ilości pokarmu organizmy dojrzeją po około 2–3 miesiącach.

Obydwa gatunki można hodować w różnych odchodach zwierzęcych. Zalecaną pożywką hodowlaną jest mieszanina obornika końskiego lub krowiego oraz torfu w stosunku 50:50. Należy kontrolować, czy krowom lub koniom, od których pozyskiwany jest obornik, nie podaje się leków ani substancji chemicznych, takich jak stymulatory wzrostu, nematocydy, lub podobnych produktów weterynaryjnych, które mogłyby negatywnie wpłynąć na organizmy w trakcie badania. Zaleca się stosowanie samodzielnie zebranego obornika pozyskanego z »organicznego« źródła, ponieważ, jak wynika z doświadczenia, dostępny na rynku obornik stosowany jako nawóz ogrodniczy może wywierać niekorzystny wpływ na organizmy. Taka pożywka powinna mieć wartość pH w przybliżeniu 6–7 (regulowane węglanem wapnia), niskie przewodnictwo jonowe (niższe niż 6 mS/cm lub 0,5 % stężenia soli) oraz nie powinna być zbyt zanieczyszczona amoniakiem lub zwierzęcym moczem. Podłoże powinno być wilgotne, ale nie nazbyt mokre. Do hodowli odpowiednie są skrzynki hodowlane o pojemności 10–50 litrów.

Aby uzyskać organizmy o standardowym wieku i standardowej wielkości (masie), hodowlę najlepiej rozpocząć z zastosowaniem kokonów. Po utworzeniu hodowli utrzymuje się ją, umieszczając osobniki dorosłe w skrzynce hodowlanej ze świeżym podłożem na 14–28 dni, aby umożliwić wytworzenie kolejnych kokonów. Następnie osobniki dorosłe usuwa się, a młode wyklute z kokonów wykorzystuje się jako podstawę do kolejnej hodowli. Organizmy nieustannie karmi się odchodami zwierzęcymi i co jakiś czas przenosi do świeżego podłoża. Doświadczenie pokazuje, że odpowiednim pokarmem jest suszony na powietrzu i drobno zmielony obornik krowi lub koński lub mąka owsiana. Należy upewnić się, czy krowom lub koniom, od których pozyskiwany jest obornik, nie podaje się substancji chemicznych, takich jak stymulatory wzrostu, które mogłyby negatywnie wpłynąć na organizmy w trakcie długoterminowej hodowli. Organizmy wyklute z kokonów wykorzystuje się do badania, gdy osiągną wiek 2–12 miesięcy i są uznawane za osobniki dorosłe.

Organizmy można uznać za zdrowe, jeśli przekopują się przez podłoże, nie próbują opuścić podłoża oraz rozmnażają się w sposób ciągły. Jeżeli dżdżownice poruszają się bardzo wolno i mają żółty tylny koniec ciała, wskazuje to na zużycie podłoża. W takim przypadku zaleca się podanie świeżego podłoża lub zmniejszenie gęstości obsady.

Dodatek 5

Techniki liczenia młodych osobników wyklutych z kokonów

Ręczne sortowanie organizmów wyjętych z gleby jest bardzo czasochłonne. Dlatego też zalecane są dwie alternatywne metody:

- a) pojemniki badawcze umieszcza się w łaźni wodnej najpierw w temperaturze 40 °C, którą następnie zwiększa się do 60 °C. Po około 20 minutach młode osobniki powinny pojawić się na powierzchni gleby, skąd można je z łatwością wyjąć i policzyć;
- b) badaną glebę można przepłukać na sicie, stosując metodę opracowaną przez van Gestela i in. (1), pod warunkiem że torf i obornik lub mąka owsiana dodane do gleby były zmielone na drobny proszek. Dwa sita (o średnicy 30 cm) o otworach wielkości 0,5 mm umieszcza się jedno na drugim. Zawartość pojemnika badawczego przemywa się na sitach mocnym strumieniem wody wodociągowej, w wyniku czego młode osobniki i kokony zatrzymują się głównie na górnym sicie. Należy pamiętać, że cała powierzchnia górnego sita powinna być wilgotna podczas tej operacji, tak aby młode unosiły się na warstwie wody, dzięki czemu nie będą wypelzały przez otwory sita. Najlepsze rezultaty uzyskuje się przy użyciu natrysku prysznicy.

Po przemyciu całego podłoża glebowego na sicie młode osobniki i kokony można spłukać z górnego sita do miski. Następnie zawartość odstawia się na chwilę, aby puste kokony wypłynęły na powierzchnię wody, a wypełnione kokony i młode organizmy opadły na dno. Stojącą wodę można następnie zlać, a młode i kokony przełożyć na szalkę Petriego zawierającą odrobinę wody. Organizmy można wyjąć w celu przeliczenia za pomocą igły lub pęsety.

Doświadczenie pokazuje, że metoda a) jest bardziej odpowiednia do ekstrakcji młodych organizmów, które można przemywać na sicie nawet o otworach 0,5 mm.

Zawsze należy jednak ustalić skuteczność metody zastosowanej do usunięcia organizmów (i w miarę potrzeby kokonów) z podłoża glebowego. W przypadku zastosowania techniki ręcznego sortowania zaleca się przeprowadzenie tej czynności dwukrotnie na wszystkich próbach.

BIBLIOGRAFIA:

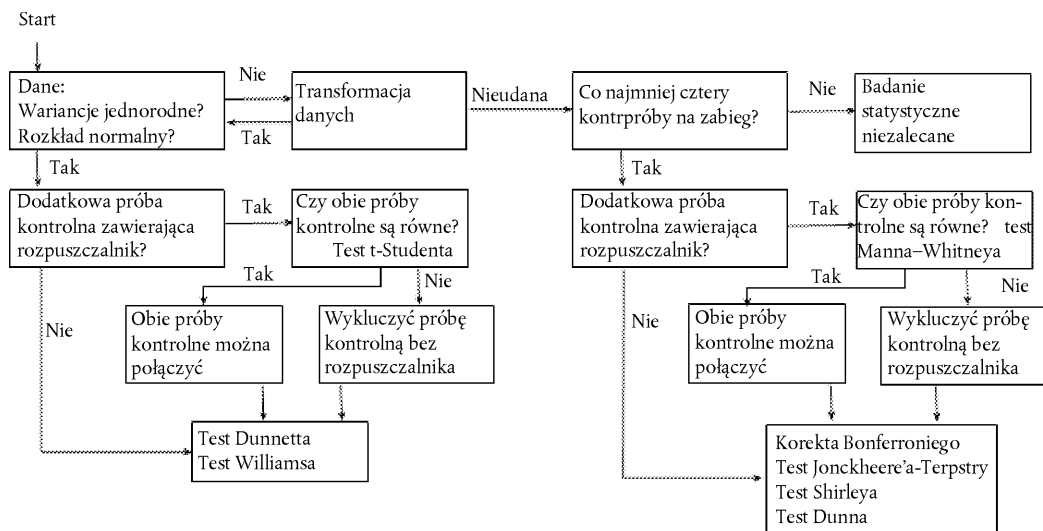
- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367–371.

Dodatek 6

Przegląd statystycznej oceny danych (oznaczanie NOEC)

Testy parametryczne

Testy nieparametryczne



C.34. OKREŚLENIE ZAHAMOWANIA AKTYWNOŚCI BAKTERII BEZTLENOWYCH – OGRANICZENIE WYTWARZANIA GAZU Z BEZTLENOWO FERMENTUJĄCYCH OSADÓW (ŚCIEKOWYCH)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 224 (2007). Substancje chemiczne odprowadzane do środowiska wodnego przechodzą przez obszary tlenowe i beztlenowe, w których mogą ulec rozkładowi lub mogą zahamować aktywność bakterii; w niektórych przypadkach mogą pozostać nienaruszone w obszarach beztlenowych przez dziesięciolecia lub dłużej. Na pierwszym etapie procesu oczyszczania ścieków, tj. na etapie osadzania wstępnego, zachodzą procesy tlenowe w supernatancie i procesy beztlenowe w osadzie pod supernatantem. Na kolejnym etapie zachodzą procesy tlenowe w komorze napowietrzania osadu czynnego oraz procesy beztlenowe w osadzie pod supernatantem w osadniku wtórnym. Osad z obu etapów poddaje się zwykle obróbce beztlenowej, w wyniku czego powstaje metan i dwutlenek węgla, które z reguły wykorzystuje się do wytwarzania energii elektrycznej. W środowisku naturalnym substancje chemiczne docierające do osadów w zatokach, ujściach rzek i morzu najczęściej pozostają w tych strefach beztlenowych na zawsze, jeśli nie ulegną biodegradacji. Większe ilości niektórych substancji chemicznych zapewne dotrą do tych obszarów ze względu na ich właściwości fizyczne, takie jak niska rozpuszczalność w wodzie, wysoka adsorpcja w zawiesinie, jak również niezdolność do biodegradacji w warunkach tlenowych.
2. Chociaż pożądane jest, aby substancje chemiczne uwalniane do środowiska ulegały biodegradacji zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, zasadnicze znaczenie ma to, aby takie substancje chemiczne nie hamowały aktywności mikroorganizmów w żadnej ze stref. W Zjednoczonym Królestwie wystąpiło kilka przypadków całkowitego zahamowania produkcji metanu spowodowanego na przykład obecnością pentachlorofenolu w odprowadzanych ściekach przemysłowych, czego skutkiem był bardzo kosztowny wywóz takiego osadu z komór fermentacyjnych w »bezpieczne« miejsca oraz przywóz zdrowych osadów fermentujących z sąsiednich instalacji. Miało jednak miejsce wiele przypadków mniej poważnego zakłócenia fermentacji przez szereg innych substancji chemicznych, w tym fluorowęglowodory alifatyczne (czyszczenie chemiczne) i detergenty, co doprowadziło do poważnego osłabienia efektywności komory fermentacyjnej.
3. Zahamowania aktywności bakterii (oddychania osadu czynnego) dotyczy tylko jedna metoda badawcza C.11 (1), w ramach której ocenia się wpływ badanych substancji chemicznych na poziom poboru tlenu w obecności podłoża. Metoda ta jest powszechnie stosowana w celu wczesnego ostrzegania przed możliwym szkodliwym wpływem substancji chemicznych na obróbkę tlenową ścieków, jak również w celu wskazania niehamujących stężeń badanych substancji chemicznych, które mają być stosowane w różnych badaniach pod kątem biodegradowalności. Metoda badawcza C.43 (2) daje ograniczoną możliwość określenia toksyczności badanej substancji chemicznej dla wytwarzania gazu przez osad beztlenowy, rozcieńczony do jednej dziesiątej normalnej zawartości substancji stałych, tak aby umożliwić wystarczająco precyzyjną ocenę odsetka biodegradacji. Ponieważ rozcieńczony osad może być bardziej wrażliwy na hamujące substancje chemiczne, grupa ISO podjęła decyzję o opracowaniu metody badania z wykorzystaniem osadu nierozcieńczonego. Przeanalizowano co najmniej trzy projekty (z Danii, Niemiec i Zjednoczonego Królestwa) i ostatecznie opracowano dwie normy ISO – jedną z wykorzystaniem osadu nierozcieńczonego, ISO 13641-1 (3), i drugą z wykorzystaniem osadu rozcieńczonego w stosunku 1:100, ISO 13641-2 (4), tak aby uwzględnić szlam i osady o niskiej populacji bakterii. Obydwie metody poddano badaniu międzylaboratoryjnemu (5); część 1 potwierdzono jako akceptowalną normę, natomiast zdania na temat części 2 były podzielone. Zjednoczone Królestwo stwierdziło, że ponieważ znaczna część uczestników zgłosiła bardzo niski poziom lub brak wytwarzania gazu, po części ze względu na zbyt wysoki procent powierzchni gazowej (75 %), aby zapewnić optymalną czułość, metoda wymaga przeprowadzenia dalszych analiz.
4. We wcześniejszych pracach prowadzonych w Zjednoczonym Królestwie (6)(7) opisywano metodę manometryczną z wykorzystaniem nierozcieńczonego osadu fermentującego oraz surowego osadu ściekowego jako podłoża w kolbach o pojemności 500 ml; aparatura ta była nieporęczna, a fetor surowego osadu był odrażający. Bardziej kompaktowe i wygodne urządzenie Sheltona i Tiedje (8) opracowane przez Battersby'ego i Wilsona (9) zostało jakiś czas później zastosowane z powodzeniem przez Wilsona i in. (10). Kawahara i in. (11) z powodzeniem przygotowali bardziej standardowe osady w laboratorium do celów wykorzystania w badaniach różnych substancji chemicznych pod kątem biodegradowalności i zahamowania w warunkach beztlenowych. Co więcej, do celów badania surowy osad jako podłoże zastąpiono osadem beztlenowym rozcieńczonym w stosunku 1:100 albo szlamem, osadami itp. o niskiej aktywności bakterii.
5. Przedmiotowa metoda może dostarczyć informacji, które są przydatne w przewidywaniu ewentualnego wpływu badanej substancji chemicznej na wytwarzanie gazu w beztlenowych komorach fermentacyjnych. Niemniej wyłącznie dłuższe badania w większym stopniu symulujące pracę komór fermentacyjnych mogą wskazać, czy może nastąpić adaptacja mikroorganizmów do badanej substancji chemicznej czy też substancje chemiczne, w przypadku których prawdopodobna jest absorpcja i adsorpcja w osadzie, mogą w miarę wpływu czasu wytworzyć stężenie toksyczne wyższe niż dozwolone w danym badaniu.

ZASADA BADANIA

6. Podwielokrotności mieszaniny beztlenowo fermentującego osadu (od 20 g/l do 40 g/l łącznej zawartości części stałych) i degradowalnego roztworu podłoża są inkubowane oddzielnie i równocześnie z różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej w zamkniętych naczyniach przez okres do 3 dni. Ilość wyprodukowanego gazu (metanu i dwutlenku węgla) mierzy się wzrostem ciśnienia (Pa) w butlach. Procent zahamowania wytwarzania gazu spowodowanego różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej oblicza się na podstawie ilości wytworzonych w poszczególnych butlach badanych i kontrolnych. EC_{50} i inne stężenia efektywne oblicza się na podstawie wykresów procentu zahamowania w stosunku do stężenia badanych substancji chemicznych albo, częściej, za pomocą jego logarytmu.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

7. Badane substancje chemiczne powinny być zwykle stosowane w najczystszej łatwo dostępnej postaci, ponieważ zanieczyszczenia występujące w niektórych substancjach chemicznych, np. chlorofenole, mogą być o wiele bardziej toksyczne niż sama badana substancja chemiczna. Należy jednak rozważyć konieczność zbadania substancji chemicznych w postaci, w jakiej są one produkowane / udostępniane na rynku. Nie zaleca się rutynowego stosowania produktu w postaci użytkowej, niemniej w przypadku słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych właściwe może być zastosowanie takiego materiału. Właściwości badanej substancji chemicznej, które powinny być znane to: rozpuszczalność w wodzie i niektórych rozpuszczalnikach organicznych, prężność pary, współczynnik adsorpcji, hydroliza i biodegradowalność w warunkach beztlenowych.

ZAKRES STOSOWANIA METODY

8. Badanie ma zastosowanie do substancji chemicznych, które są rozpuszczalne albo nierozpuszczalne w wodzie, z uwzględnieniem lotnych substancji chemicznych. Należy jednak zachować szczególną uwagę w przypadku materiałów o niskiej rozpuszczalności w wodzie (zob. bibliografia pozycja (12)) oraz o dużej lotności. Można również wykorzystać inokula z innych obszarów beztlenowych, np. szlam, gleby nasycone czy osady. Beztlenowe systemy bakteryjne, które uprzednio były narażone na toksyczne substancje chemiczne, można zaadaptować, tak aby utrzymać ich aktywność w obecności ksenobiotycznych substancji chemicznych. Inokula z zaadaptowanych systemów bakteryjnych mogą wykazywać wyższą tolerancję na badane substancje chemiczne w porównaniu z inokulami uzyskanymi z niezaadaptowanych systemów.

SUBSTANCJE CHEMICZNE ODNIESIENIA

9. W celu sprawdzenia procedury bada się chemiczną substancję odniesienia, ustawiając odpowiednie naczynia równolegle w ramach zwykłych rund badania; wykazano, że 3,5-dichlorofenol jest stałym inhibitorem beztlenowego wytwarzania gazu, jak również zużycia tlenu przez osad czynny i inne reakcje biochemiczne. Jak wykazano, dwie pozostałe substancje chemiczne, tj. metyleno-bis(tiocyanian) i pentachlorofenol, mają większy wpływ hamujący na produkcję metanu niż 3,5-dichlorofenol, niemniej wyniki z udziałem tych substancji nie zostały potwierdzone. Pentachlorofenol nie jest zalecany ze względu na fakt, że nie jest łatwo dostępny w czystej postaci.

ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW

10. W międzynarodowym badaniu międzylaboratoryjnym (5) odnotowano jedynie zadowalającą odtwarzalność w wartościach EC_{50} wśród 10 uczestniczących laboratoriów dla 3,5-dichlorofenolu i kwasu 2-bromoetano-sulfonowego. (Zakres dla pierwszego wynosił od 32 mg/l do 502 mg/l, zaś dla drugiego – 220–2 190 mg/l.)

Liczba laboratoriów	W mg/l			W mg/g osadu		
	średnia	odchylenie standardowe	cv(%)	średnia	odchylenie standardowe	cv(%)
	3,5-dichlorofenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	kwas 2-bromoetano-sulfonowy					
10	1 058	896	85	34	26	76

Wartości EC₅₀ uzyskane w badaniu międzylaboratoryjnym – nierozcieńczony osad.

11. Wysokie współczynniki zmienności między poszczególnymi laboratoriami w dużym zakresie odzwierciedlają różnice we wrażliwości mikroorganizmów osadowych wynikające z ich wcześniejszego narażenia na badaną substancję chemiczną lub inną substancję o zbliżonym składzie chemicznym lub z braku takiego narażenia. Wartość EC₅₀ określono na podstawie stężenia osadu z dokładnością niewiele większą niż wartość »objętościową« (mg/l). Trzy laboratoria, które zanotowały dokładne wartości EC₅₀ dla 3,5-dichlorofenolu, wykazały współczynniki zmienności (odpowiednio 22 %, 9 %, i 18 % dla EC₅₀ mg/g) znacznie niższe niż średnia tych współczynników dla wszystkich dziesięciu laboratoriów. Poszczególne średnie dla tych trzech laboratoriów wynosiły odpowiednio 3,1, 3,2 i 2,8 mg/g. Niższe dopuszczalne współczynniki zmienności między laboratoriami porównane ze znacznie wyższymi współczynnikami między wartościami laboratoryjnymi, mianowicie 9–22 % por. 92 %, wskazują na występowanie znacznych różnic we właściwościach poszczególnych osadów.

OPIS METODY

Aparatura

12. Wymagany jest zwykły sprzęt laboratoryjny i następujące przyrządy:

- a) inkubator – iskrobezpieczny, z regulacją temperatury $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- b) ciśnieniowe szklane naczynia badawcze o odpowiednich wymiarach nominalnych ⁽¹⁾, każde wyposażone w gazoszczelną septę, która może wytrzymać ciśnienie około 2 barów lub $2 \times 10^5\text{ Pa}$ (jako powłoki użyć np. PTFE = politetrafluoroetylen). Szklane butelki do surowicy o pojemności nominalnej 125 ml i pojemności rzeczywistej około 160 ml, zamknięte szczelnymi septami ⁽²⁾ i obciskanymi pierścieniami aluminiowymi; z powodzeniem można stosować też butelki o całkowitej pojemności wynoszącej 0,1–1 l;
- c) precyzyjny ciśnieniomierz ⁽³⁾ i połączenie z igłą;
- całkowite wytwarzanie gazu (metanu i dwutlenku węgla) mierzone za pomocą ciśnieniomierza przystosowanego do mierzenia i uwalniania wytworzonego gazu; przykładem takiego odpowiedniego urządzenia jest ręczny precyzyjny ciśnieniomierz podłączony do igły strzykawkowej; gazoszczelny zawór trójdrogowy ułatwia obniżenie nadmiernego ciśnienia (dodatek 1). Wewnętrzna objętość przewodów przetwornika ciśnienia i zaworu powinna być jak najmniejsza, aby błędy wynikające z pominięcia objętości aparatury były niewielkie;
- d) izolowane pojemniki wykorzystywane do transportowania osadu fermentującego;
- e) trójdrogowe zawory ciśnieniowe;
- f) sito o kwadratowych oczkach wielkości 1 mm;
- g) zbiornik do fermentowania osadu – szklana lub wykonana z polietylenu o wysokiej gęstości butelka o pojemności około 5 litrów wyposażona w mieszadło i urządzenia umożliwiające przepuszczanie strumienia azotu (zob. pkt 13) przez fazę nadpowierzchniową;
- h) filtry membranowe (0,2 µm) przeznaczone do sterylizacji podłoża;

⁽¹⁾ Zalecana pojemność to 0,1–1 l.

⁽²⁾ Zaleca się stosowanie gazoszczelnych sept silikonowych. Zaleca się również przetestowanie gazoszczelności sept, w szczególności butylowych sept kauczukowych, ponieważ niektóre septy dostępne w handlu nie są wystarczająco gazoszczelne w przypadku metanu, a niektóre nie zachowują szczelności, kiedy przekłuje się je igłą w warunkach badania.

— Zaleca się stosowanie powlekanych sept gazoszczelnych, a w przypadku lotnych substancji chemicznych istnieje obowiązek stosowania takich sept (niektóre dostępne w handlu septy są stosunkowo cienkie, ich grubość wynosi mniej niż 0,5 cm i nie zachowują gazoszczelności po przekłuciu igłą strzykawkowej);

— zaleca się stosowanie butylowych sept kauczukowych (około 1 cm), w przypadku gdy substancje badane nie są substancjami lotnymi (septy te zachowują zwykle gazoszczelność po przekłuciu);

— przed przetestowaniem zaleca się dokładne zbadanie sept pod kątem ich gazoszczelności po przekłuciu.

⁽³⁾ Ciśnieniomierz należy stosować i kalibrować w regularnych odstępach czasu zgodnie z instrukcją producenta. W przypadku zastosowania ciśnieniomierza o zalecanej jakości, np. wyposażonego w stalową membranę, niepotrzebna jest kalibracja w laboratorium. Kalibrację ciśnieniomierza powinna przeprowadzać licencjonowana instytucja w zalecanych odstępach czasu. Dokładność kalibracji można sprawdzić w laboratorium za pomocą jednopunktowego pomiaru pod ciśnieniem $1 \times 10^5\text{ Pa}$ z wykorzystaniem ciśnieniomierza z odczytem mechanicznym. Jeżeli ciśnienie w tym punkcie zostanie zmierzone poprawnie, liniowość również pozostanie niezmienną. Jeżeli stosuje się inne urządzenia pomiarowe (bez kalibracji certyfikowanej przez producenta), konwersję zaleca się przeprowadzać w całym zakresie w regularnych odstępach czasu (dodatek 2).

- i) mikrostrzykawki służące do gazoszczelnego połączenia przetwornika ciśnienia (zob. pkt 12 lit. c)) z fazą nadpowierzchniową w butelkach (zob. pkt 12 lit. b)), a także do dodawania nierozpuszczalnych ciekłych materiałów badanych do butelek;
- j) komora rękawicowa, opcjonalnie, ale zalecana, w której utrzymywane jest niewielkie nadciśnienie azotu.

Odczynniki

- 13. W całym badaniu należy stosować odczynniki czyste do analizy. W całym badaniu należy stosować wysokiej czystości azot z zawartością tlenu nieprzekraczającą 5 µl/l.

Woda

- 14. Jeżeli na jakimkolwiek etapie badania wymagane jest rozcieńczenie, należy zastosować wodę dejonizowaną, która została wcześniej odpowietrzona. Nie ma potrzeby sporządzania analitycznych prób kontrolnych tej wody, ale należy zapewnić regularny przegląd aparatury służącej do dejonizacji. Stosować wodę dejonizowaną także do przygotowywania roztworu podstawowego. Przed dodaniem inokulum beztlenowego do jakiegokolwiek roztworu lub przed rozcieńczeniem badanego materiału upewnić się, że roztwór i badany materiał są odtlenione. Można to zrobić, przepuszczając przez wodę rozcieńczającą (lub rozcieńczenia) azot przez 1 godzinę przed dodaniem inokulum, lub alternatywnie, podgrzewając wodę rozcieńczającą do punktu wrzenia i schładzając ją do temperatury pokojowej w atmosferze beztlenowej.

Przefermentowany osad

- 15. Aktywnie fermentujący osad pobrać z komory fermentacyjnej oczyszczalni ścieków lub z laboratoryjnej komory fermentacyjnej, w której oczyszczane są głównie ścieki domowe. Informacje praktyczne dotyczące osadu pochodzącego z laboratoryjnej komory fermentacyjnej można znaleźć w pozycji bibliograficznej (11). Jeżeli przewiduje się zastosowanie zaadaptowanego inokulum, można brać pod uwagę zastosowanie fermentującego osadu z oczyszczalni ścieków przemysłowych. Do pobierania osadu używać butelek z szeroką szyjką, wykonanych z polietylenu o wysokiej gęstości lub podobnego materiału, który może się rozszerzać. Napęlić butelki do pobierania próbek osadem do wysokości około 1 cm od wylotu butelki i szczelnie zamknąć, najlepiej używając do tego celu zaworu bezpieczeństwa (pkt 12 lit. e)), a następnie w celu zminimalizowania szoku termicznego umieścić w izolowanych pojemnikach (pkt 12 lit. d)) do momentu przeniesienia ich do inkubatora, którego temperaturę utrzymuje się na poziomie $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Otwierając butelki, należy pamiętać o obniżeniu nadmiernego ciśnienia gazu przez ostrożne rozszczelnienie korka lub za pomocą trójdrogowego zaworu ciśnieniowego (pkt 12 lit. e)). Zaleca się wykorzystanie osadu w ciągu kilku godzin od pobrania, w przeciwnym wypadku należy przechowywać go w temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ w fazie nadpowierzchniowej azotu, jednak nie dłużej niż przez 3 dni, gdyż w takim okresie występuje zwykle niewielka utrata aktywności.

Uwaga – Fermentujący osad wytwarza łatwopalne gazy, które powodują ryzyko pożaru i wybuchu: zawiera również potencjalnie patogenne organizmy, dlatego mając do czynienia z osadem, należy zachować właściwe środki ostrożności. Ze względów bezpieczeństwa do pobierania osadu nie stosować szklanych naczyń.

Inokulum

- 16. Bezpośrednio przed zastosowaniem należy połączyć osad, delikatnie mieszając go i przepuszczając przez sito o oczkach wielkości 1 mm² (pkt 12 lit. f)) do odpowiedniej butelki (pkt 12 lit. g)) przez której fazę nadpowierzchniową przechodzi strumień azotu. Odłożyć próbkę do pomiaru stężenia całkowitej zawartości substancji stałych (zob. np. norma ISO 11923 (13) lub równoważna norma UE). Zasadniczo stosować osad bez jego rozcieńczania. Stężenie części stałych wynosi zwykle 2–4 % (stężenie masowe). Sprawdzić wartość pH osadu i w razie potrzeby skorygować do $7 \pm 0,5$.

Podłoże użyte w badaniu

- 17. W 100 ml wody dejonizowanej rozpuścić 10 g pożywki bulionowej (np. Oxoid), 10 g wyciągu z drożdży i 10 g D-glukozy. Wysterylizować, filtrując na filtrze membranowym 0,2 µm (pkt 12 lit. h)), i natychmiast zastosować lub przechowywać w temperaturze 4 °C nie dłużej niż 1 dzień.

Badana substancja chemiczna

- 18. Przygotować oddzielny roztwór podstawowy dla każdej rozpuszczalnej w wodzie badanej substancji chemicznej, tak aby zawierał na przykład 10 g/l substancji chemicznej w odtlenionej wodzie rozcieńczającej (pkt 14). Stosować odpowiednie objętości tych roztworów podstawowych w celu przygotowania mieszanin reakcyjnych zawierających progresywne stężenia. Alternatywnie przygotować serię rozcieńczeń każdego roztworu podstawowego, tak aby objętość dodana do butelek badawczych była taka sama dla każdego wymaganego stężenia końcowego. W razie potrzeby skorygować pH roztworów podstawowych do $7 \pm 0,2$.

19. W przypadku badanych substancji chemicznych, które są niewystarczająco rozpuszczalne w wodzie, sprawdzić w normie ISO 10634 (12) lub równoważnej normie UE. Jeżeli wymagane jest zastosowanie rozpuszczalnika organicznego, unikać rozpuszczalników takich jak chloroform lub tetrachlorek węgla, o których wiadomo, że znacząco hamują wytwarzanie metanu. Przygotować roztwór o odpowiednim stężeniu, składający się z nierozpuszczalnej w wodzie substancji chemicznej rozpuszczonej we właściwym rozpuszczalniku lotnym, na przykład acetonie, eterze dietylowym. Dodać wymaganą objętość roztworu z rozpuszczalnikiem do pustych butelek badawczych (pkt 12 lit. b)) i odparować rozpuszczalnik przed dodaniem osadu. W odniesieniu do innych zabiegów stosować normę ISO 10634 (12) lub równoważną normę UE, jednak należy pamiętać o tym, że wszelkie środki powierzchniowo czynne wykorzystywane do produkcji emulsji mogą być inhibitorem beztlenowego wytwarzania gazu. Jeżeli uznaje się, że obecność rozpuszczalników organicznych i środków emulgujących powoduje powstanie artefaktów, badaną substancję chemiczną można dodać bezpośrednio do badanej mieszaniny w postaci substancji w proszku lub cieczy. Lotne substancje chemiczne i nierozpuszczalne w wodzie ciekłe badane substancje chemiczne można wstrzyknąć do butelek do surowicy zawierających inokulum, używając mikrostrzykawek (pkt 12 lit. i)).
20. Dodać badane substancje chemiczne do butelek w celu uzyskania geometrycznego ciągu stężeń, na przykład, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l i 15,6 mg/l. Jeżeli na podstawie podobnych substancji chemicznych nie można określić zakresu toksyczności, w celu określenia odpowiedniego zakresu należy najpierw przeprowadzić wstępne badanie ustalające zakres przy wykorzystaniu stężeń 1 000 mg/l, 100 mg/l i 10 mg/l.

Substancja chemiczna odniesienia

21. Przygotować roztwór wodny 3,5-dichlorofenolu (10 g/l), stopniowo dodając minimalną ilość roztworu wodorotlenku sodu, wynoszącą 5 mol/l, do substancji stałej i jednocześnie mieszając powstający roztwór do momentu jego rozpuszczenia. Następnie dodać odtlenioną wodę rozcieńczającą (pkt 14) do wymaganej objętości; sonikacja może wspomóc proces rozpuszczania. Inne substancje chemiczne odniesienia można stosować w przypadku uzyskania średniego zakresu EC₅₀ w co najmniej trzech badaniach wykorzystujących różne inokula (inne źródła lub inne czasy pobrania inokulów).

INTERFERENCJA/BŁĘDY

22. Niektóre składniki osadu mogłyby przypuszczalnie reagować z potencjalnymi inhibitorami enzymatycznymi, sprawiając, że będą one niedostępne dla mikroorganizmów, a przez to skutkując niskim zahamowaniem lub jego brakiem. Również w przypadku gdy osad zawiera już substancję chemiczną będącą inhibitorem enzymatycznym, uzyskano by błędny wynik, gdyby tę substancję chemiczną poddano badaniu. Oprócz tych możliwości istnieje szereg zidentyfikowanych czynników, które mogą prowadzić do błędnych wyników. Czynniki te wymieniono w dodatku 3 wraz z metodami eliminowania lub przynajmniej ograniczania błędów.

PROCEDURA BADANIA

23. Liczba koniecznych kontrprób zależy od stopnia dokładności wymaganego w odniesieniu do wskaźników zahamowania. W przypadku gdy korki butelek są wystarczająco gazoszczelne przez cały okres badania, stosować tylko jedną partię (obejmującą co najmniej trzy naczynia) butelek badawczych w odniesieniu do każdego wymaganego stężenia. Podobnie stosować jedną partię butelek z substancją chemiczną odniesienia i jeden zbiór prób kontrolnych. Jeżeli korki butelek nadają się tylko do jednorazowego przekłucia lub niewielkiej liczby przekłuć, zastosować partię (np. obejmującą trzy naczynia) butelek badawczych w odniesieniu do każdego odstępu czasowego (t), dla którego wymagane są wyniki dotyczące wszystkich stężeń badanej substancji chemicznej, które mają zostać zbadane. Podobnie zastosować »t« partii butelek w odniesieniu do substancji chemicznej odniesienia i w odniesieniu do prób kontrolnych.
24. Zaleca się wykorzystanie komory rękawicowej (pkt 12 lit. j)). Co najmniej 30 minut przed rozpoczęciem badania rozpocząć przepuszczanie azotu przez komorę rękawicową wyposażoną w cały niezbędny sprzęt. Dopilnować, aby podczas manipulowania butelkami i szczelnego zamykania butelek temperatura osadu wynosiła 35 °C ± 2 °C

Badanie wstępne

25. Jeżeli aktywność osadu nie jest znana, zaleca się wykonanie badania wstępnego. Sporządzić próby kontrolne w celu uzyskania na przykład stężeń części stałych wynoszących 10 g/l, 20 g/l i 40 g/l z podłożem, ale bez użycia badanej substancji chemicznej. Należy również stosować różne objętości mieszaniny reakcyjnej w celu uzyskania trzech lub czterech stosunków objętości fazy nadpowierzchniowej względem objętości cieczy. Na podstawie wyników zmierzonej objętości gazów w różnych odstępach czasu wybrać najbardziej odpowiednie warunki umożliwiające dokonywanie dwa razy dziennie pomiarów z pozyskaniem każdego dnia znacznych objętości gazu i obniżeniem ciśnienia przy optymalnej czułości ⁽¹⁾ i bez zagrożenia eksplozjami.

⁽¹⁾ Dotyczy to zestawu doświadczalnego i warunków doświadczalnych, w których można oszacować objętości wytworzonego gazu – w ślepych próbach kontrolnych i naczyniach wykazujących 70–80 % zahamowania – z dopuszczalnymi marginesami błędów.

Dodanie badanych substancji chemicznych

26. Napełnić puste butelki badawcze rozpuszczalnymi w wodzie badanymi substancjami chemicznymi (pkt 12 lit. b)) w formie roztworów wodnych (pkt 18). W odniesieniu do każdego zakresu stężeń stosować zbiory butelek obejmujące co najmniej trzy naczynia (pkt 20). W przypadku gdy badana substancja chemiczna nie rozpuszcza się lub słabo się rozpuszcza, przy użyciu mikrostrzykawki wstrzyknąć jej roztwory w rozpuszczalnikach organicznych do pustych butelek w celu uzyskania zbiorów kontrprób każdego z pięciu stężeń badanej substancji chemicznej. Odparować rozpuszczalnik przez przepuszczenie strumienia azotu nad powierzchnią roztworów w butelkach badawczych. Alternatywnie dodać nierozpuszczalną stałą substancję chemiczną w formie ważonych ilości substancji chemicznej bezpośrednio do butelek badawczych.
27. Jeżeli nie dodaje się nierozpuszczalnych i słabo rozpuszczalnych w wodzie ciekłych badanych substancji chemicznych przy użyciu rozpuszczalnika, dodać je za pomocą mikrostrzykawki bezpośrednio do butelek badawczych po dodaniu inokulum i substratu użytego w badaniu (zob. pkt 30). W ten sam sposób można dodawać lotne badane substancje chemiczne.

Dodanie inokulum i substratu

28. Wmieszać odpowiednią objętość przesianego osadu fermentującego (zob. pkt 16) w 5-litrowej butelce (pkt 12 lit. g)), przy jednoczesnym przepuszczaniu strumienia azotu przez fazę nadpowierzchniową. W celu usunięcia powietrza wypłukać butelki badawcze, zawierające roztwory wodne lub odparowane roztwory badanej substancji chemicznej z rozpuszczalnikiem, pod strumieniem azotu przez około dwie minuty. Umieścić podwielokrotności, np. 100 ml, dobrze wymieszanego osadu w butelkach badawczych za pomocą pipety z dużą końcówką lub cylindra miarowego. Istotne jest napełnienie pipety jednorazowo dokładną wymaganą objętością osadu ze względu na łatwość osadzania się części stałych osadu. W przypadku pobrania zbyt dużej ilości osadu należy opróżnić pipetę i jeszcze raz pobrać osad.
29. Następnie należy dodać wystarczającą ilość roztworu substratu (pkt 17), aby każda pożywka bulionowa, wyciąg z drożdży i D-glukoza w mieszaninie uzyskały stężenie wynoszące 2 g/l, a jednocześnie nadal płukać azotem. Poniżej przedstawiono przykład dla badanych partii.

Końcowe stężenie masowe badanej substancji chemicznej w butelkach badawczych (mg/l)	Objętość badanej substancji chemicznej (ml)		Odczynniki i podłoża (ml)		
	Roztwór podstawowy a) 10 g/l pkt 18	Roztwór podstawowy b) 1 g/l pkt 18	Woda rozcieńczająca pkt 14	Inokulum pkt 16	Podłoże pkt 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

Całkowita pojemność butelki = 160 ml. Objętość cieczy = 103 ml.

Objętość gazu = 57 ml lub 35,6 % całkowitej objętości.

30. Podobnie przepłukać dostatecznie azotem puste butelki badawcze, aby móc w nich usunąć wszelkie lotne lub nierozpuszczalne ciekłe badane substancje chemiczne (zob. pkt 27).

Próby kontrolne i substancja chemiczna odniesienia

31. W celu sporządzenia próby kontrolnej zastosować zestawy butelek obejmujące co najmniej trzy naczynia, zawierające wyłącznie osad i podłoże. Przygotować kolejne butelki z kontrpróbą zawierające osad i podłoże oraz wystarczającą ilość roztworu podstawowego substancji chemicznej odniesienia, 3,5-dichlorofenolu (pkt 21), potrzebną do uzyskania stężenia końcowego wynoszącego 150 mg/l. Takie stężenie powinno hamować wytwarzanie gazu o około 50 %. Alternatywnie przygotować zakres stężeń substancji chemicznej odniesienia. Ponadto przygotować cztery dodatkowe butelki do pomiaru pH zawierające osad, odtlenioną wodę i podłoże. Dodać badaną substancję chemiczną do dwóch butelek w najwyższych badanych stężeniach, a do pozostałych dwóch butelek dodać odtlenioną wodę.

32. Zapewnić, aby wszystkie butelki – butelki badawcze, butelki zawierające substancje chemiczne odniesienia i butelki do prób kontrolnych – zawierały tę samą objętość (V_R) cieczy; w razie konieczności dodać odtlenioną wodę dejonizowaną (pkt 14), aby osiągnąć tę wymaganą objętość. Faza nadpowierzchniowa powinna stanowić 10–40 % pojemności butelki, a jej faktyczną wartość ustala się na podstawie danych uzyskanych w badaniu wstępnym. Po dodaniu wszystkich składników do butelek usunąć igłę, przez którą wypływa gaz, i szczelnie zamknąć każdą butelkę za pomocą kauczukowego korka z nasadką aluminiową (pkt 12 lit. b)), zwilżając korek kroplą wody dejonizowanej, aby ułatwić jego umieszczenie. Wstrząsnąć każdą butelką w celu wymieszania jej zawartości.

Inkubacja butelek

33. Przenieść butelki do regulowanego termostatycznie inkubatora, najlepiej wyposażonego we wstrząsarkę, i utrzymywanego w temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Butelki inkubuje się bez dostępu światła. Po upływie około godziny wyrównać ciśnienie w butelkach do ciśnienia atmosferycznego, wprowadzając igłę strzykawki dołączoną do ciśnieniomierza (pkt 12 lit. c)) kolejno przez korek każdej butelki, otworzyć zawór i odczekać aż ciśnieniomierz wskaże zero, po czym zamknąć zawór. Igłę należy umieścić pod kątem około 45° w celu uniemożliwienia wyciekania gazu z butelek. Jeżeli butelki są inkubowane w inkubatorach bez wstrząsarek, dwa razy dziennie ręcznie wstrząsać każdą butelką przez cały okres inkubacji w celu stabilizacji układu. Inkubować butelki i odwrócić je w celu uniemożliwienia jakiegokolwiek utraty gazu przez septę. Odwracanie nie jest jednak wskazane w przypadkach gdy nierozpuszczalne badane substancje chemiczne mogą przylegać do dna kolby.

Pomiar ciśnienia

34. Jeżeli butelki osiągnęły temperaturę $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, zmierzyć i zanotować wartość pH zawartości dwóch z czterech butelek przygotowanych do celów badania, a następnie usunąć ich zawartość; kontynuować inkubowanie pozostałych butelek bez dostępu światła. Mierzyć i notować wartość ciśnienia w butelkach dwa razy dziennie przez kolejne 48–72 godziny, wprowadzając igłę ciśnieniomierza przez korek każdej kolejnej butelki, przy czym pomiędzy pomiarami należy igłę osuszyć. W czasie pomiaru przechowywać wszystkie elementy butelki w temperaturze inkubacji, a pomiar ten należy przeprowadzić możliwie najszybciej. Umożliwić ustabilizowanie i zanotowanie odczytu ciśnienia. Następnie otworzyć zawór w celu wentylacji i zamknąć, gdy ciśnieniomierz wskaże zero. Kontynuować badanie zwykle przez 48 godzin od momentu pierwszego wyrównania ciśnienia, oznaczonego jako »godzina 0«. Liczba odczytów i powtórzeń wentylacji powinna być ograniczona w przypadku lotnych substancji chemicznych do jednego (pod koniec inkubacji) lub dwóch w celu minimalizacji straty badanej substancji chemicznej (10).
35. W przypadku odczytu ciśnienia wskazującego na wartości ujemne nie otwierać zaworu. W igle i rurkach strzykawek zbiera się czasem wilgoć, na co wskazują niewielkie ujemne wartości odczytu ciśnienia. W takim przypadku należy igłę wyjąć, wstrząsnąć rurką, wysuszyć ją za pomocą bibuły, a następnie podłączyć nową igłę.

Pomiar pH

36. Zmierzyć i zanotować wartość pH zawartości każdej butelki po przeprowadzeniu końcowego pomiaru ciśnienia.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Przedstawienie wyników

37. Obliczyć sumę i średnią wartości ciśnienia zanotowanych w każdym odstępie czasowym w odniesieniu do każdego zbioru butelek z kontrpróbą i obliczyć średnie sumaryczne ciśnienie gazu brutto w każdym odstępie czasowym w odniesieniu do każdego zbioru kontrprób. Wykreślić krzywe średniego sumarycznego wytwarzania gazu (Pa) w funkcji czasu w odniesieniu do butelek z próbą kontrolną, butelek badawczych i butelek odniesienia. Wybrać czas na liniowej części krzywej, zwykle 48 godzin, i na podstawie poniższego równania obliczyć procentowe zahamowanie (I) w odniesieniu do każdej wartości stężenia [1]:

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

gdzie

I procentowe zahamowanie, wyrażone w %;

P_t ciśnienie gazu wytworzone za pomocą badanego materiału w wybranym czasie, wyrażone w paskalach (Pa);

P_c ciśnienie gazu wytworzone w próbie kontrolnej w tym samym czasie, wyrażone w paskalach (Pa).

Zaleca się sporządzenie obu wykresów, tj. wykresu I w funkcji stężenia oraz w funkcji logarytmu stężenia, tak aby można było wybrać krzywą o bardziej liniowym kształcie. Ocenic wartość EC_{50} (mg/l) wizualnie lub za pomocą analizy regresji na podstawie krzywej o bardziej liniowym kształcie. Do celów porównawczych bardziej przydatne może być wyrażenie stężenia substancji chemicznej jako mg substancji chemicznej / g całkowitej zawartości części stałych. Aby uzyskać to stężenie, należy podzielić stężenie objętościowe (mg/l) przez stężenie objętościowe części stałych suchego osadu (g/l) (pkt 16).

38. Obliczyć procentowe zahamowanie spowodowane przez określone stężenie zastosowanej substancji chemicznej odniesienia lub EC_{50} , jeżeli zbadano wystarczającą liczbę stężeń.
39. Przeliczyć średnie ciśnienie gazu wytworzonego w próbie kontrolnej P_c (Pa) na objętość, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej ciśnieniomierza (dodatek 2) i na podstawie tego obliczyć wydajność gazową, wyrażoną jako objętość wytworzona w ciągu 48 godzin ze 100 ml nierozcieńczonego osadu w stężeniu części stałych wynoszącym od 2 % (20 g/l) do 4 % (40 g/l).

Kryteria ważności

40. Wyniki uzyskane w międzylaboratoryjnym badaniu ISO (5) wykazały, że substancja chemiczna odniesienia (3,5-dichlorofenol) wywołała 50-procentowe zahamowanie wytwarzania gazu w zakresie stężeń wynoszącym 32–510 mg/l przy średniej wartości 153 mg/l (10). Zakres ten jest tak szeroki, że nie można z wystarczającą pewnością wyznaczyć stałych limitów w odniesieniu do zahamowania jako kryteriów ważności; możliwość taka powinna istnieć w przypadkach, w których rezultaty badań wykazały, w jaki sposób można wytworzyć bardziej spójne inokula. Objętości gazu wytworzonego w kontrolnych butlach w ciągu 48 godzin wahały się w zakresie 21–149 ml/g suchej masy osadu (ze średnią 72 ml/g). Nie istniał żaden oczywisty związek między objętością wytworzonego gazu a odpowiadającą jej wartością EC_{50} . Końcowa wartość pH wahała się w zakresie 6,1–7,5.
41. Badanie uważa się za ważne, jeżeli w próbie kontrolnej odniesienia zawierającej 150 mg/l 3,5-dichlorofenolu uzyska się zahamowanie większe niż 20 %, w próbie ślepej wytworzy się ponad 50 ml gazu na gram suchej masy, a na końcu badania wartość pH mieści się w zakresie 6,2–7,5.

Sprawozdanie z badania

42. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje.

Badana substancja chemiczna

- nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna, numer CAS, wzór strukturalny i istotne właściwości fizykochemiczne;
- czystość (zanieczyszczenia) badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

- objętości zawartości ciekłych i fazy nadpowierzchniowej w naczyniach badawczych;
- opisy naczyń badawczych i pomiar gazu (np. rodzaj ciśnieniomierza);
- wprowadzenie badanej substancji chemicznej i substancji chemicznej odniesienia do układu badawczego, zastosowane badane stężenie i stosowanie wszelkich rozpuszczalników;
- informacje dotyczące zastosowanego inokulum: nazwa oczyszczalni ścieków, opis źródła oczyszczonych ścieków (np. temperatura robocza, czas retencji osadu, głównie ścieki domowe lub przemysłowe itd.), stężenie części stałych, aktywność wytwarzania gazu w beztlenowej komorze fermentacyjnej, poprzednie narażenie lub ewentualna wstępna adaptacja do toksycznych substancji chemicznych lub miejsce pobrania szlamu, osadu itp.;
- temperatura i zakres inkubacji;
- liczba kontrprób.

Wyniki

- wartości pH pod koniec badania;
- w razie potrzeby wszystkie dane zmierzone w naczyniach badawczych, naczyniach z próbą ślepą i naczyniach z próbą kontrolną wykonaną na substancji chemicznej odniesienia (np. ciśnienie w Pa lub milibarach) w formie tabeli;
- procentowe zahamowanie w butelkach badawczych i butelkach odniesienia oraz krzywe wykresu zahamowanie–stężenie;
- obliczenie wartości EC_{50} , wyrażonych w mg/l i mg/g;
- wytwarzanie gazu na gram osadu w ciągu 48 godzin;
- uzasadnienie ewentualnego odrzucenia wyników badania;
- omówienie wyników, obejmujące wszelkie odchylenia od procedur stosowanych w tej metodzie badawczej, oraz omówienie wszelkich odchyleń w wynikach badania w stosunku do oczekiwanych wyników, wynikających z interferencji i błędów;
- określenie, czy celem badania było zmierzenie toksyczności dla mikroorganizmów wstępnie narażonych, czy dla takich, które nie były wstępnie narażone.

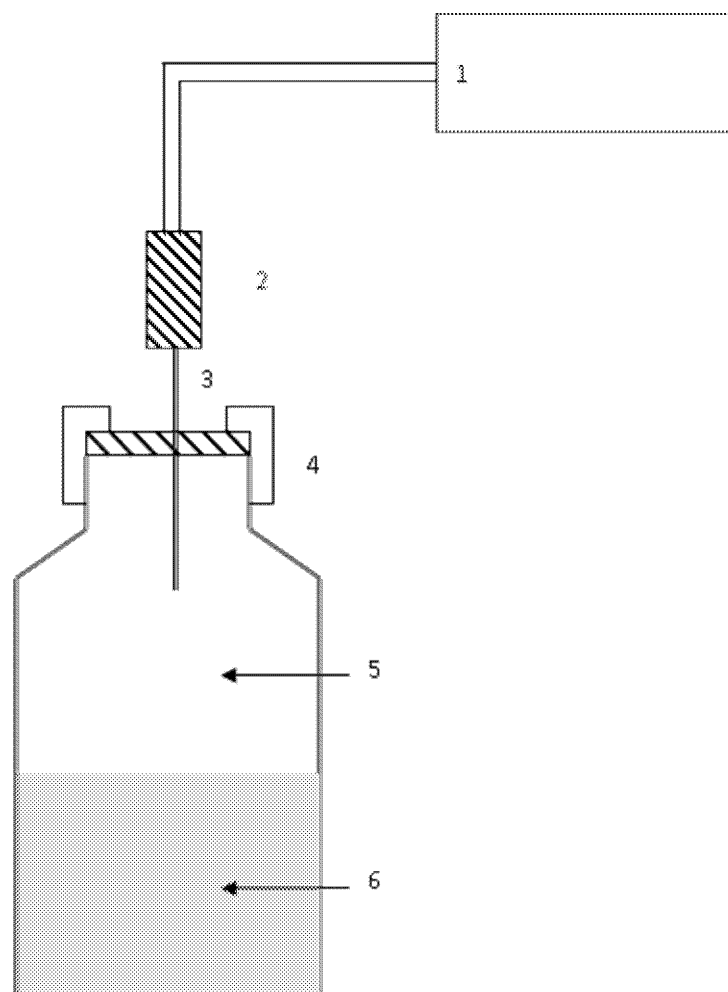
BIBLIOGRAFIA

- (1) Rozdział C.11 niniejszego załącznika: Osad czynny, badanie zahamowania oddychania.
- (2) Rozdział C.43 niniejszego załącznika: Biodegradowalność beztlenowa związków organicznych w przefermentowanym osadzie: za pomocą pomiaru wytwarzanego gazu.
- (3) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (2003) ISO 13641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.
- (4) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (2003) ISO 13641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.
- (5) ISO (2000) badanie międzylaboratoryjne ISO 13641-1 i ISO 13641-2. 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, w: 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 N.S. i Wilson V. (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2 441-2 460.
- (10) Wilson V., Painter H.A. i Battersby N.S. (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Niemcy (1990). wyd. Steinberg C i Kettrup A, s. 117–132 (1992).

- (11) Kawahara K., Yakabe Y., Chida T. i 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) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1995) ISO 10634 Jakość wody – Wytyczne dotyczące przygotowania i obróbki słabo rozpuszczalnych związków organicznych w celu oceny ich biodegradacji w środowisku wodnym.
 - (13) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1997) ISO 11923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.
-

Dodatek 1

Przykład aparatury do mierzenia wytwarzania biogazu na podstawie ciśnienia gazu



Legenda:

- 1 – ciśnieniomierz
- 2 – gazoszczelny zawór 3-drogowy
- 3 – igła do strzykawki
- 4 – gazoszczelny korek (obciskana nasadka i septa)
- 5 – faza nadpowierzchniowa
- 6 – inokulum z przefermentowanego osadu

Naczynia badawcze w środowisku o temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

Dodatek 2

Przeliczanie odczytów ciśnieniomierza

Odczyty z ciśnieniomierza można powiązać z objętościami gazu, wykorzystując w tym celu standardową krzywą i na podstawie tego można obliczyć objętość gazu wytworzoną na gram suchego osadu w ciągu 48 godzin. Ten wskaźnik aktywności stosuje się jako jedno z kryteriów oceny ważności wyników badań. Krzywą kalibracyjną wykreśla się na podstawie wstrzykiwania znanych objętości gazu w temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ do butelek do surowicy, zawierających objętość wody równą objętości mieszaniny reakcyjnej V_R :

- umieścić podwielkrotności V_R ml wody, utrzymywane w temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, w pięciu butelkach do surowicy. Butelki szczelnie zamknąć i pozostawić na 1 godzinę w łaźni wodnej w temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ do stabilizacji;
- włączyć ciśnieniomierz, poczekać aż się ustabilizuje, i ustawić wartość zerową;
- wprowadzić igłę strzykawki przez korek jednej z butelek, otworzyć zawór i odczekać aż ciśnieniomierz wskaże zero, po czym zamknąć zawór;
- procedurę tę należy powtórzyć w przypadku pozostałych butelek;
- do każdej butelki wstrzyknąć 1 ml powietrza o temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Wprowadzić igłę (na mierniku) przez korek jednej z butelek i poczekać, aż odczyt ciśnienia ustabilizuje się. Zanotować ciśnienie, otworzyć zawór i odczekać, aż ciśnieniomierz wskaże zero, po czym zamknąć zawór;
- procedurę tę należy powtórzyć w przypadku pozostałych butelek;
- powtórzyć całą procedurę z zastosowaniem 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml i 50 ml powietrza;
- wykreślić krzywą przeliczeniową ciśnienia (Pa) w funkcji objętości wstrzykniętego gazu (ml). Dane wskazane przez instrument mają charakter liniowy w zakresie od 0 Pa do 70 000 Pa oraz od 0 ml do 50 ml wytwarzanego gazu.

Dodatek 3

Zidentyfikowane czynniki, które mogą prowadzić do błędnych wyników**a) Jakość nasadek do butelek**

W handlu dostępne są różne rodzaje sept do butelek do surowicy; wiele z nich, w tym butylowe septy kauczukowe, tracą gazoszczelność po przekłuciu igłą w warunkach tego badania. Czasami po przekłuciu septy igłą strzykawki ciśnienie spada bardzo wolno. Zaleca się stosowanie gazoszczelnych sept w celu uniknięcia wycieków (pkt 12 lit. b)).

b) Wilgoć w igle strzykawki

W igle i rurkach strzykawek zbiera się czasem wilgoć wykazana przez odczyty ciśnienia wskazujące niewielkie wartości ujemne. Aby pozbyć się wilgoci, należy usunąć igłę, wstrząsnąć rurką, wysuszyć ją za pomocą bibuły, a następnie podłączyć nową igłę (pkt 12 lit. c) i pkt 35).

c) Zanieczyszczenie tlenem

Metody beztlenowe podlegają błędom wynikającym z zanieczyszczenia tlenem, które może spowodować mniejsze wytwarzanie gazu. W tej metodzie możliwość zanieczyszczenia tlenem powinna być zminimalizowana przez zastosowanie wyłącznie technik beztlenowych, w tym komory rękawicowej.

d) Wyraźne elementy podłoża w osadzie

Na beztlenowe wytwarzanie gazu i wrażliwość osadu wpływają elementy podłoża przenoszone z inokulum do butelek badawczych. Przefermentowany osad pochodzący z domowych beztlenowych komór fermentacyjnych często dalej zawiera rozpoznawalną materię, taką jak pozostałości włosów i roślin w celulozie, które zwykle utrudniają pobieranie próbek reprezentatywnych. Można usunąć wyraźną nierozpuszczalną materię z osadu poprzez przesianie, co zwiększy prawdopodobieństwo próbek reprezentatywnych (pkt 16).

e) Lotne badane substancje chemiczne

Lotne badane substancje chemiczne zostaną uwolnione do fazy nadpowierzchniowej butelek badawczych. Takie uwolnienie może skutkować utratą niektórych badanych materiałów z układu w czasie odgazowywania po pomiarze ciśnienia i błędnym wykazaniem wysokich wartości EC_{50} . Odpowiednio wybierając stosunek objętości fazy nadpowierzchniowej względem objętości cieczy i nie odgazowując po zmierzeniu ciśnienia, można ograniczyć błąd (10).

f) Nieliniowość wytwarzania gazu

Jeżeli wykres średniego sumarycznego wytwarzania gazu w funkcji czasu inkubacji nie jest w przybliżeniu liniowy w okresie 48 godzin, dokładność badania może być obniżona. Aby rozwiązać ten problem, zalecane może być wykorzystanie osadu fermentującego pochodzącego z różnych źródeł lub dodanie zwiększonego stężenia podłoża użytego w badaniu – pożywki bulionowej, wyciągu z drożdży i glukozy (pkt 29).

Dodatek 4

Zastosowanie do próbek środowiskowych o niskim stężeniu biomasy – beztlenowy szlam, osady itp.

WPROWADZENIE

- A.1 Ogólnie rzecz biorąc, szczególna aktywność mikrobiologiczna (objętość wytworzonego gazu na gram części stałych) naturalnie występującego szlamu beztlenowego, osadu, gleby itp., jest znacznie niższa niż aktywność mikrobiologiczna beztlenowego osadu pochodzącego ze ścieków. Z tego powodu, jeżeli zmierzone ma zostać działanie hamujące substancji chemicznych w stosunku do tych mniej aktywnych próbek, należy zmodyfikować niektóre warunki doświadczalne. W przypadku tych mniej aktywnych próbek możliwe są dwie ogólne metody działania:
- a) wykonanie zmodyfikowanego badania wstępnego (pkt 25) na nierozcieńczonym próbce szlamu, gleby itp. w temperaturze $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ lub w temperaturze miejsca pobrania próbki w celu uzyskania dokładniejszej symulacji (jak w części 1 normy ISO 13641);
- b) lub wykonanie badania z rozcieńczonym (1 na 100) osadem pochodzącym z komory fermentacyjnej w celu symulacji niskiej aktywności oczekiwanej w odniesieniu do próbki środowiskowej, ale przy utrzymaniu temperatury $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (jak w części 2 normy ISO 13641).
- A.2 Wariant a) można uzyskać za pomocą następującej metody opisanej tutaj (równoważnej względem części 1 normy ISO 13641), ale konieczne jest wykonanie badania wstępnego (pkt 25) w celu zapewnienia optymalnych warunków, o ile nie są one jeszcze znane na podstawie poprzednich badań. Próbkę szlamu lub osadu powinna być dokładnie wymieszana, np. w wyrzäsarce, i w razie potrzeby rozcieńczona w niewielkiej ilości odpowietrzonej wody rozcieńczającej (pkt 14), tak aby istniała możliwość przeniesienia jej np. za pomocą pipety o grubej końcówce lub cylindra miarowego. Jeżeli uznaje się, że może brakować składników odżywczych, można odwirować próbkę szlamu (w warunkach beztlenowych) i ponownie zawiesić w pożywce mineralnej zawierającej wyciąg z drożdży (A.11).
- A.3 Wariant b). Wariant ten odpowiednio obrazuje niską aktywność próbek środowiskowych, ale wykazuje brak wysokiego stężenia zawieszin występujących w tych próbkach. Nie jest znana rola tych części stałych w zahamowaniu, ale możliwe jest, że reakcja zachodząca między tymi badanymi substancjami chemicznymi i składnikami szlamu oraz adsorpcja badanych substancji chemicznych do części stałych mogłyby obniżyć toksyczność badanej substancji chemicznej.
- A.4 Innym istotnym czynnikiem jest temperatura: na potrzeby samej symulacji, badania można wykonywać w temperaturze miejsca pobrania próbki, ponieważ różne grupy konsorcjów bakterii wytwarzających metan funkcjonują w różnych zakresach temperatur, mianowicie bakterie termofilne ($\sim 30\text{--}35\text{ }^{\circ}\text{C}$), mezofilne ($20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) i psychrofilne ($< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), które mogą wykazywać różne modele pod względem zahamowania.
- A.5 Czas trwania. W badaniu ogólnym, opisanym w części 1, wykonanym przy zastosowaniu nierozcieńczonego osadu, ilość gazu wytworzonego w ciągu 2–4 dni była zawsze wystarczająca, natomiast w badaniu międzylaboratoryjnym, opisanym w części 2, wykonanym przy zastosowaniu osadu rozcieńczonego w stosunku jeden do stu, w tym samym okresie nie wytworzono gazu lub wytworzono niewystarczającą jego ilość. Madsen i in. (1996), opisując to drugie badanie, stwierdził, że powinno się dopuścić wykonywanie tego badania przez co najmniej 7 dni.

Wykonywanie badania przy niskim stężeniu biomasy (wariant b)

Należy wprowadzić następujące zmiany, dodając treść do niektórych istniejących punktów i podpunktów tekstu głównego lub zastępując te punkty i podpunkty.

- A.6 W pkt 6 dodaje się treść w brzmieniu: zasada badania;
- »Tę technikę można wykorzystać w przypadku rozcieńczenia beztlenowego osadu w stosunku 1 do 100, częściowo w celu symulacji niskiej aktywności szlamu i osadów. Temperatura inkubacji może wynosić $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ lub może być równa temperaturze miejsca, z którego pobrano próbkę. Ponieważ w nierozcieńczonym osadzie aktywność bakterii jest znacznie mniejsza, okres inkubacji należy wydłużyć do co najmniej 7 dni«.
- A.7 W pkt 12 lit. a) dodaje się treść w brzmieniu:
- »powinna istnieć możliwość utrzymywania inkubatora w temperaturze minimalnej $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ «.

A.8 Po pkt 13 dodaje się dodatkowy odczynnik:

»kwas fosforowy (H_3PO_4), 85 % masy w wodzie«.

A.9 Na końcu pkt 16 dodaje się zdanie w brzmieniu:

»Zastosować stężenie końcowe całkowitej zawartości części stałych w badaniu wynoszące $0,20 \pm 0,05$ g/l«.

A.10 Zob. pkt 17. Podłoże użyte w badaniu

Nie należy stosować tego podłoża, ale zastąpić je wyciągiem z drożdży (zob. pkt 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 Do beztlenowego rozcieńczania osadu wymagane jest podłoże mineralne, obejmujące pierwiastki śladowe, i dla wygody do tego podłoża dodaje się substrat organiczny – wyciąg z drożdży.

Po pkt 17 dodaje się litery w brzmieniu:

»a) badane podłoże mineralne, zawierające wyciąg z drożdży.

Przygotowuje się je z podłoża o 10-krotnym stężeniu (pkt 17 lit. b; A.12) z roztworem pierwiastka śladowego (pkt 17 lit. c; A.13). Zastosować świeżo dostarczony dziewięciowodny siarczek sodu, (pkt 17 lit. b; A.12) lub przemycić i osuszyć dziewięciowodny siarczek sodu przed zastosowaniem, aby miał wystarczającą zdolność redukcji. Jeżeli badanie jest wykonywane bez wykorzystania komory rękawicowej (pkt 12 lit. j)), należy zwiększyć stężenie siarczku sodu w roztworze podstawowym do 2 g/l (z 1 g/l). Siarczek sodu można też dodać z odpowiedniego roztworu podstawowego przez septę zamkniętych butelek badawczych, ponieważ taka procedura zmniejsza ryzyko utleniania, w celu uzyskania stężenia końcowego wynoszącego 0,2 g/l. Alternatywnie można zastosować cytrynian tytanu (III) (pkt 17 lit. b)). Należy dodać go przez septę zamkniętych butelek badawczych w celu uzyskania stężenia 0,8 mmol/l do 1,0 mmol/l. Cytrynian tytanu (III) stanowi wysoce skuteczny środek redukujący o niskiej toksyczności, który przygotowuje się w następujący sposób: rozpuścić 2,94 g cytrynianu trisodu, dihydratu w 50 ml odtlenionej wody rozcieńczającej (pkt 14) (w wyniku czego powstaje roztwór 200 mmol/l) i dodać 5 ml roztworu chlorku tytanu (III) (15 g/100 ml wody rozcieńczającej). Należy zneutralizować go do pH $7 \pm 0,5$ za pomocą węglanu sodu i umieścić w odpowiedniej butelce do surowicy pod strumieniem azotu. Stężenie cytrynianu tytanu (III) w tym roztworze podstawowym wynosi 164 mmol/l. Natychmiast zastosować pożywkę lub przechowywać w temperaturze 4°C nie dłużej niż 1 dzień;

A.12 b) pożywka o dziesięciokrotnym stężeniu, przygotowывana przy użyciu:

bezwodnego diwodorofosforanu potasu (KH_2PO_4)	2,7 g
wodorofosforanu sodu (Na_2HPO_4)	4,4 g
(lub 11,2 g dwunastowodnego wodorofosforanu sodu);	5,3 g
chlorku amonu (NH_4Cl)	
chlorku wapnia, dwuwodnego ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,75 g
chlorku magnezu, sześciowodnego ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
chlorku żelaza (II), czterowodnego ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
resaryzyny (wskaźnika redoks)	0,01 g;
siarczku sodu, dziewięciowodnego ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
(lub cytrynianu tytanu (III)) stężenie końcowe	0,8 mmol/l do 1,0 mmol/l
roztworu pierwiastka śladowego (zob. pkt 17 lit. c; A.13)	10,0 ml
wyciągu z drożdży	100 g
Rozpuścić w wodzie rozcieńczającej (pkt 14) i dopełnić do:	1 000 ml;

A.13 c) roztwór pierwiastka śladowego, przygotowany przy użyciu:

chlorku manganu (II), czterowodnego ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
kwasu borowego (H_3BO_3)	0,05 g

chlorku cynku (ZnCl_2)	0,05 g
chlorku miedzi (II) (CuCl_2)	0,03 g
molibdenianu sodu, dwuwodnego ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
chlorku kobaltu (II), sześciowodnego ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
chlorku niklu (II), sześciowodnego ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
selenianu disodu (Na_2SeO_3)	0,05 g
Rozpuścić w wodzie rozcieńczającej (pkt 14) i dopełnić do:	1 000 ml«.

A.14 Zob. pkt 25: badanie wstępne

Konieczne jest wykonanie badania wstępnego zgodnie z opisem zawartym w pkt 24, z tym, że stężenia części stałych osadu powinny wynosić jedną setną podanych stężeń, tj. 0,1 g/l, 0,2 g/l i 0,4 g/l. Czas trwania inkubacji powinien wynosić co najmniej 7 dni.

Uwaga: w badaniu międzylaboratoryjnym (5) objętość fazy nadpowierzchniowej była zbyt wysoka – na poziomie 75 % całkowitej objętości; powinna zawierać się w zalecanym zakresie 10–40 %. Istotne kryterium stanowi, że objętość gazu wytwarzanego przy zahamowaniu na poziomie 80 % powinna być możliwa do zmierzenia z akceptowalną precyzją (np. od $\pm 5\%$ do $\pm 10\%$).

A.15 Punkty 26–30: dodanie badanej substancji chemicznej, inokulum i podłoża.

Powyższe substancje dodaje się w taki sam sposób jak opisano w tych punktach, z tym że roztwór podłoża (pkt 17) zastępuje się pożywką oraz podłożem z wyciągu z drożdży (A.11).

Ponadto stężenie końcowe suchych części stałych osadu obniża się z 2 g/l–4 g/l do $0,2 \pm 0,05$ g/l (A.9). Dwa przykłady dodania składników do mieszaniny stosowanej w badaniu przedstawiono w tabeli A.1, którą zastępuje się tabelę w pkt 29.

A.16 Punkt 33: inkubacja butelek

Ze względu na mniejszą intensywność wytwarzania gazu, czas trwania inkubacji wynosi co najmniej 7 dni.

A.17 Punkt 34: pomiary ciśnienia

Do pomiaru ciśnienia fazy nadpowierzchniowej w butelkach stosuje się taką samą procedurę, jaką określono w pkt 34, jeżeli wymagane są wartości w fazie gazowej. Jeżeli wymaga się dokonania pomiaru całkowitych ilości CO_2 plus CH_4 , pH fazy ciekłej obniża się do około pH 2 poprzez wstrzyknięcie H_3PO_4 do każdej właściwej butelki oraz dokonanie pomiaru po 30 minutach wstrząsania w temperaturze badania. Więcej informacji na temat jakości inokulum można uzyskać jednak poprzez dokonanie pomiaru ciśnienia w każdej butelce przed zakwaszeniem i po zakwaszeniu. Przykładowo, jeżeli intensywność wytwarzania CO_2 jest znacznie wyższa niż intensywność wytwarzania metanu, czułość bakterii fermentacyjnych może ulec zmianie lub badana substancja chemiczna w pierwszej kolejności wywiera wpływ na bakterie metanogenne.

A.18 Punkt 36: pomiar pH

Jeżeli ma zostać zastosowane H_3PO_4 , do celów pomiaru pH należy przygotować dodatkowe butelki, do których nie dodaje się H_3PO_4 .

BIBLIOGRAFIA

Madsen, T., Rasmussen, H.B. i Nilsson, L. (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Insytut Jakości Wody, Duńska Agencja Ochrony Środowiska, Kopenhaga.

Tabela A.1

Przykłady konfiguracji badawczej dla badanych partii

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Przykład 1	Przykład 2	Normalna kolejność dodawania
Stężenie przygotowanego inokulum (g/l)	0,42	2,1	—
Objętość dodawanego inokulum (ml)	45	9	4
Stężenie inokulum w butelkach badawczych (g/l)	0,20	0,20	—
Objętość dodawanej pożywki (ml)	9	9	2
Objętość dodawanej wody rozcieńczającej (ml)	36	72	3
Stężenie wyciągu z drożdży w butelkach badawczych (g/l)	9,7	9,7	—
Objętość roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej (ml)	3	3	1
Całkowita objętość cieczy (ml)	93	93	—

*Dodatek 5***Definicje**

Dla celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

C.35 BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD DENNY-WODA NA LUMBRICULUS Z WYKORZYSTANIEM WZBOGAONEGO OSADU**WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 225 (2007). Organizmy bentosowe żyjące w osadzie są potencjalnie narażone na związane w osadzie substancje chemiczne, w związku z czym należy zwrócić na nie szczególną uwagę, np. (1), (2), (3). Wśród tych organizmów czerpiących pokarm z osadu znajdują się skąposzczety wodne, których rola w osadach systemów wodnych jest istotna. Przyczyniając się do bioturbacji osadu oraz stanowiąc żer dla innych organizmów, zwierzęta te mogą mieć silny wpływ na biodostępność takich substancji dla innych organizmów, np. ryb poszukujących pokarmu w osadzie. W przeciwieństwie do organizmów żyjących na powierzchni osadów, wodne skąposzczety żyjące w osadach (np. *Lumbriculus variegatus*) zakopują się w osadzie i zjadają cząstki osadu znajdujące się pod jego powierzchnią. Powoduje to narażenie organizmów użytych do badania na badaną substancję chemiczną przez wiele dróg absorpcji (np. przez bezpośredni kontakt i spożycie zanieczyszczonych cząstek osadu, lecz również przez wodę porową i wodę nadosadową).
2. Niniejsza metoda badawcza ma służyć ocenie skutków długotrwałego narażenia żyjących w osadach skąposzczetów *Lumbriculus variegatus* (Müller) na działanie substancji chemicznych związanych z osadem. Metoda ta opiera się na istniejących metodach badania toksyczności osadu i protokołach badania bioakumulacji, np. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Niniejszą metodę opisano w odniesieniu do warunków badania statycznego. Scenariusz narażenia stosowany w tej metodzie badawczej polega na wzbogacaniu osadu badaną substancją chemiczną. Stosowanie wzbogaconego osadu ma na celu symulację osadu zanieczyszczonego badaną substancją chemiczną.
3. Substancje chemiczne, które należy przebadać pod kątem organizmów żyjących w osadach, zwykle pozostają w tym układzie przez długi czas. Organizmy żyjące w osadach mogą być narażone poprzez różne drogi. Względne znaczenie danej drogi narażenia i czas, jaki jest potrzebny, by przyczyniła się ona do ogólnych skutków toksycznych, zależy od fizykochemicznych właściwości danej substancji chemicznej i jej ostatecznego działania na zwierzę. W przypadku silnie adsorbujących substancji chemicznych (np. substancji o $\log K_{ow} > 5$) lub w przypadku substancji chemicznych tworzących wiązania kowalencyjne z osadem drogą narażenia o istotnym znaczeniu może być przyjmowanie zanieczyszczonego pokarmu. Aby nie doprowadzić do zaniżenia toksyczności takich substancji chemicznych, pokarm niezbędny do rozmnażania i rozwoju organizmów używanych do badania dodaje się do osadu przed zastosowaniem badanej substancji chemicznej (11). Niniejszą metodą badawczą przedstawiono w sposób wystarczająco szczegółowy, aby umożliwić wykonanie badania, pozwalając jednocześnie na wprowadzanie zmian w projekcie doświadczenia, w zależności od warunków w konkretnych laboratoriach i zróżnicowanych właściwości badanych substancji chemicznych.
4. Celem niniejszej metody badawczej jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na rozrodczość i biomasa organizmów użytych do badania. Mierzonymi parametrami biologicznymi są całkowita liczba żyjących organizmów oraz zawartość biomasy (suchej masy) na koniec okresu narażenia. Dane te poddaje się analizie poprzez zastosowanie modelu regresji celem oszacowania stężenia, przy którym wpływ osiągnąłby poziom $x\%$ (np. EC_{50} , EC_{25} , i EC_{10}) albo poprzez zastosowanie metody testowania hipotez statystycznych w celu określenia stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) oraz najniższego stężenia, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC).
5. W rozdziale C.27 niniejszego załącznika, »Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconego osadu« (6), zawarto wiele informacji istotnych i przydatnych do zastosowania przedstawionej metody badawczej dotyczącej toksyczności osadu. W związku z tym niniejszy dokument stanowi podstawę, według której opracowano zmiany konieczne do wykonania badań toksyczności osadu z wykorzystaniem gatunku *Lumbriculus variegatus*. Ponadto zawarto odniesienia do takich dokumentów jak: Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates (3) opracowany przez ASTM, Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (7) opracowany przez EPA oraz Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (12) opracowany przez ASTM. Dodatkowo głównym źródłem informacji, z którego korzystano przy opracowywaniu niniejszego dokumentu, jest doświadczenie praktyczne zdobyte w trakcie wykonywania badań międzylaboratoryjnych z wykorzystaniem niniejszej metody badawczej (sprawozdanie z badania międzylaboratoryjnego, (13)).

WARUNKI WSTĘPNE I WYTYCZNE

6. Informacje na temat badanej substancji chemicznej, obejmujące np. środki ostrożności, odpowiednie warunki przechowywania i metody analityczne, należy uzyskać przed rozpoczęciem badania. Dalsze wytyczne dotyczące badania substancji chemicznych o własnościach fizykochemicznych utrudniających wykonanie badania przedstawiono w pozycji (14) bibliografii.

7. Przed rozpoczęciem badania powinny być znane następujące informacje o badanej substancji chemicznej:
 - nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna (najlepiej nazwa wg IUPAC), wzór strukturalny, numer CAS, czystość;
 - prężność pary;
 - rozpuszczalność w wodzie.
8. Przed rozpoczęciem badania warto zgromadzić następujące dodatkowe informacje:
 - współczynnik podziału oktanol-woda, K_{ow} ;
 - współczynnik węgiel organiczny-woda, wyrażony jako K_{oc} ;
 - hydroliza;
 - fototransformacja w wodzie;
 - biodegradowalność;
 - napięcie powierzchniowe.
9. Informacje na temat niektórych właściwości osadu, jaki należy zastosować, powinno się uzyskać przed rozpoczęciem badania (7). Informacje szczegółowe zawarto w pkt 22–25.

ZASADA BADANIA

10. Osobniki o podobnym stanie fizjologicznym (zsynchronizowane, jak określono w dodatku 5) poddaje się narażeniu na działanie szeregu stężeń substancji toksycznej wprowadzanych do osadu w układzie osad-woda. Jako pożywkę należy stosować sztuczny osad i wodę regenerowaną. Naczynia badawcze bez zawartości badanej substancji chemicznej stanowią próby kontrolne. Badaną substancją chemiczną wzbogaca się całą objętość osadu w odniesieniu do każdego poziomu stężenia, aby ograniczyć do minimum zmienność między kontrpróbami dla każdego poziomu stężenia, a następnie organizmy użyte do badania wprowadza się do naczyń badawczych, w których ustabilizowano stężenia badanej substancji w osadzie i wodzie (zob. pkt 29). Zwierzęta użyte do badań naraża się na działanie substancji chemicznej w układach osad-woda przez 28 dni. W związku z niską zawartością składników odżywczych w osadzie sztucznym, do osadu należy dodać źródło pokarmu (zob. pkt 22–23 oraz dodatek 4), aby organizmy rozwijały się i rozmnażały w warunkach kontrolowanych. W ten sposób można zagwarantować, że zwierzęta użyte do badań będą narażone zarówno przez wodę i osad, jak i przez pożywienie.
11. Preferowanym punktem końcowym w tego rodzaju badaniu jest osiągnięcie EC_x (np. EC_{50} , EC_{25} , i EC_{10} ; stężenie, przy którym obserwuje się zmiany mające wpływ na x % organizmów użytych do badania) w odniesieniu do odpowiednio rozrodczości i biomasy, w porównaniu do próby kontrolnej. Należy jednak pamiętać, że biorąc pod uwagę wysoki stopień niepewności pomiaru niskiego EC_x (np. EC_{10} , EC_{25}) wraz ze skrajnie wysokimi granicami ufności na poziomie 95 % (np. (15)) oraz moc statystyczną obliczaną podczas testu hipotez, za najbardziej wiarygodny punkt końcowy uznaje się EC_{50} . Ponadto można obliczyć stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), oraz najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), w odniesieniu do zawartości biomasy i poziomu rozrodczości, jeżeli obliczenia te znajdują potwierdzenie w projekcie badania i danych (zob. pkt 34–38). Projekt badania będzie zależny od celu badania, jakim jest uzyskanie EC_x lub NOEC.

BADANIA PORÓWNAWCZE

12. Oczekuje się, że zdolność danego laboratorium do wykonywania badania skuteczność zostanie w wystarczającym stopniu wykazana na podstawie badania organizmów kontrolnych, a w przypadku gdy dane historyczne są dostępne, powtarzalności badania. Ponadto można wykonywać porównawcze badania toksyczności w regularnych odstępach czasu, stosując substancję toksyczną odniesienia, aby ocenić wrażliwość organizmów użytych do badania. Porównawcze badania toksyczności trwające 96 godzin wykonywane tylko w wodzie z powodzeniem mogą wykazywać wrażliwość i stan zwierząt użytych do badań (4), (7). Informacje na temat toksyczności pentachlorofenolu (PCP) w pełnych badaniach (narażenie przez 28 dni we wzbogaconym osadzie) zawarto w dodatku 6 oraz w sprawozdaniu dotyczącym badania międzylaboratoryjnego z wykorzystaniem niniejszej metody badawczej (13). Ostrą toksyczność PCP, odnoszącą się wyłącznie do wody, opisano np. w pozycji (16) bibliografii. Informacje te można wykorzystać w celu porównania wrażliwości organizmu użytego do badania w badaniach porównawczych, w których stosuje się PCP jako substancję toksyczną odniesienia. Na potrzeby badania *L. variegatus* zaleca się stosowanie chlorku potasu (KCl) lub siarczanu miedzi ($CuSO_4$) jako substancji toksycznych odniesienia (4) (7). Ustalenie kryteriów jakości w oparciu o dane dotyczące toksyczności KCl do dziś sprawia trudności ze względu na brak danych na temat *L. variegatus* w literaturze. Informacje na temat toksyczności miedzi w stosunku do *L. variegatus* można znaleźć w pozycjach bibliografii (17)–(21).

WAŻNOŚĆ BADANIA**13. Aby badanie było ważne, należy spełnić następujące warunki:**

- w badaniu międzylaboratoryjnym (13) należy wykazać, że w przypadku *Lumbriculus variegatus* średnia liczba żywych osobników na jedną kontrpróbę w próbach kontrolnych powinna wzrosnąć co najmniej 1,8-krotnie na koniec okresu narażenia w stosunku do liczby osobników na kontrpróbę na początku okresu narażenia;
- pH warstwy wody nadosadowej należy utrzymać na poziomie 6–9 przez cały czas trwania badania;
- stężenie tlenu w wodzie nadosadowej nie powinno być niższe niż 30 % wartości nasycenia powietrzem (ASV) w temperaturze badania w trakcie badania.

OPIS METODY BADAWCZEJ**Układ badawczy**

14. Zaleca się stosowanie systemów statycznych bez wymiany wody nadosadowej. Jeżeli stosunek osadu do wody (zob. pkt 15) jest odpowiedni, delikatne napowietrzanie jest zwykle wystarczające, aby utrzymać jakość wody na poziomie dopuszczalnym dla organizmów użytych do badania (np. maksymalizacja poziomów stężenia rozpuszczonego tlenu, minimalizacja odkładania się produktów wydaliniczych). Układy półstatyczne lub przepływowe z okresowym lub stałym odnawianiem wody nadosadowej należy stosować wyłącznie w wyjątkowych przypadkach, ponieważ oczekuje się, że regularne odnawianie wody nadosadowej naruszy równowagę chemiczną (np. spowoduje utratę badanej substancji chemicznej z układu badawczego).

Naczynia badawcze i aparatura badawcza

15. Narażenie przeprowadza się w szklanych zlewkach o pojemności 250 ml i średnicy 6 cm. Inne naczynia także mogą nadawać się do badania, powinny jednak zapewniać odpowiednią głębokość wody nadosadowej i warstwę osadu. W każdym naczyniu należy umieścić warstwę osadu preparowanego o grubości około 1,5–3 cm. Stosunek głębokości warstwy osadu do głębokości wody nadosadowej powinien wynosić 1:4. Naczynia powinny mieć odpowiednią pojemność, zgodnie ze wskaźnikiem obciążenia, tj. liczbą badanych osobników dodawanych na jednostkę masy osadu (zob. również pkt 39).
16. Naczynia badawcze i inna aparatura badawcza, mające kontakt z badaną substancją chemiczną, powinny być w całości wykonane ze szkła lub innych chemicznie obojętnych materiałów. W odniesieniu do wszystkich części sprzętu należy starać się unikać stosowania materiałów, które mogą rozpuścić badaną substancję chemiczną, sprawić, że ulegnie ona absorpcji, lub też wypłukać inne substancje chemiczne, a także materiałów, które mają szkodliwe działanie na zwierzęta użyte do badań. Sprzęt mający kontakt z badanymi pożywkami musi być wykonany z politetrafluoroetyleny (PTFE), ze stali nierdzewnej lub szkła. W przypadku organicznych substancji chemicznych wymagane może być użycie szkła silanizowanego. W takich sytuacjach sprzęt po użyciu należy wyrzucić.

Badany gatunek

17. Badanym gatunkiem wykorzystywanym w tym badaniu jest słodkowodny skąposzczet *Lumbriculus variegatus* (Müller). Gatunek ten toleruje różne rodzaje osadu i jest powszechnie stosowany w badaniach toksyczności i bioakumulacji (np. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)). W sprawozdaniu należy przedstawić pochodzenie zwierząt użytych do badań, potwierdzenie identyfikacji gatunku (np. (36)) oraz warunki hodowli. Potwierdzenie identyfikacji gatunku nie jest wymagane przed każdym badaniem, jeśli organizmy pochodzą z hodowli wewnątrzlaboratoryjnej.

Hodowla organizmów używanych do badania

18. Aby zapewnić wystarczającą liczbę osobników do wykonania badań toksyczności osadu, warto przechowywać je w stałej hodowli laboratoryjnej. Wytyczne dotyczące metod hodowli *Lumbriculus variegatus* oraz źródeł hodowli starterowych zawarto w dodatku 5. Aby uzyskać szczegółowe informacje na temat tworzenia hodowli tego gatunku, zob. (3), (7), (27).
19. W mieć pewność, że w badaniach stosowano zwierzęta tego samego gatunku, zdecydowanie zaleca się tworzenie hodowli jednego gatunku. Należy zadbać, aby hodowle, a w szczególności osobniki wykorzystywane w badaniach, nie wykazywały dających się zaobserwować oznak chorób ani anomalii.

Woda

20. Zgodnie z rozdziałem C.1 niniejszego załącznika (37) w badaniach zaleca się stosowanie wody regenerowanej jako wody nadosadowej; można wykorzystywać ją również w laboratoryjnych hodowlach organizmów (zob. dodatek 2, aby uzyskać informacje na temat przygotowania). W razie potrzeby można stosować wodę naturalną. Jakość wybranej wody powinna umożliwiać rozwój i rozmnażanie badanych gatunków przez okres trwania aklimatyzacji i okres badań, a także nie powodować pojawiania się ich nietypowego wyglądu lub zachowania. Wykazano, że w takiej wodzie osobniki z gatunku *Lumbriculus variegatus* są w stanie przeżyć, rozwijać się i rozmnażać (30), a także zapewnia się w ten sposób maksymalną standaryzację warunków badania i hodowli. W przypadku gdy stosuje się wodę regenerowaną, w sprawozdaniu należy podać jej skład oraz właściwości przed użyciem, w tym co najmniej odczyn pH, zawartość tlenu oraz twardość (wyrażoną jako mg CaCO_3/l). Wykonanie badania wody na obecność mikrozanieczyszczeń przed jej użyciem może dostarczyć również użytecznych informacji (zob. np. dodatek 3).
21. Odczyn pH wody nadosadowej powinien mieścić się w przedziale 6,0–9,0 (zob. pkt 13). Jeżeli oczekuje się podniesienia poziomu amoniaku, za użyteczne uznaje się utrzymywanie pH na poziomie 6,0–8,0. W przypadku wykonywania badań np. słabych kwasów organicznych zaleca się dostosowanie pH poprzez buforowanie wody, która ma zostać wykorzystana na potrzeby badania, w sposób opisany np. w pozycji bibliografii (16). Całkowita twardość wody stosowanej w badaniu powinna wynosić 90–300 mg CaCO_3 na litr w przypadku wody naturalnej. W dodatku 3 zawarto podsumowanie dodatkowych kryteriów dotyczących dopuszczalnej wody rozcieńczającej według wytycznej OECD nr 210 (38).

Osad

22. Ponieważ niezanieczyszczone, naturalne osady pochodzące z określonego źródła mogą nie być dostępne przez cały rok, a organizmy rodzime oraz obecność mikrozanieczyszczeń mogą mieć wpływ na badanie, w opisanym tu badaniu zaleca się stosowanie osadu preparowanego (zwanego również osadem regenerowanym, sztucznym lub syntetycznym). Stosowanie osadu preparowanego i wprowadzenie rodzimej fauny ograniczają do minimum zmienność warunków badania. Zgodnie z (6), (39) i (40) podstawę opisanego poniżej osadu preparowanego stanowi osad sztuczny. Na potrzeby tego badania zaleca się stosowanie ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):
- a) 4–5 % torfu sfagnowego (w przeliczeniu na suchą masę); ważne jest, by stosować torf w postaci sproszkowanej, o »średnim« stopniu rozkładu, drobno zmielonego (wielkość cząstek $\leq 0,5$ mm); suszonego wyłącznie powietrzem;
 - b) 20 ± 1 % glinki kaolinowej (w przeliczeniu na suchą masę) (zawartość kaolinitu najlepiej powyżej 30 %);
 - c) 75–76 % piasku kwarcowego (w przeliczeniu na suchą masę) (drobnego piasku o wielkość ziaren: ≤ 2 mm, ale > 50 % cząstek powinno mieścić się w przedziale 50–200 μm);
 - d) wody dejonizowanej, 30–50 % suchej masy osadu, oprócz suchych składników osadu;
 - e) chemicznie czysty węglan wapnia (CaCO_3) dodaje się w celu dostosowania pH końcowej mieszaniny osadu;
 - f) zawartość całkowitego węgla organicznego w mieszaninie końcowej powinna wynosić 2 % ($\pm 0,5$ %) suchej masy osadu i należy ją dostosować przy użyciu odpowiednich ilości torfu i piasku, zgodnie z lit. a) i c);
 - g) np. sproszkowanych liści pokrzywy zwyczajnej (z gatunku *Urtica*, zgodnie z farmaceutycznymi standardami dotyczącymi spożycia przez ludzi) lub mieszaniny sproszkowanych liści z gatunku *Urtica* i alfa celulozy (1:1) na poziomie 0,4–0,5 % suchej masy osadu jako dodatku do składników suchego osadu; aby uzyskać więcej informacji, zob. dodatek 4.
23. Źródło torfu, glinki kaolinowej, surowca pokarmowego i piasku powinno być znane. Jako dodatek do lit. g) w rozdziale C.27 niniejszego załącznika (6) wymieniono alternatywne surowce roślinne stosowane jako źródła pokarmu: suszone liście morwy białej (*Morus alba*), koniczyny białej (*Trifolium repens*), szpinaku (*Spinacia oleracea*) lub trawy zbóż.
24. Wybrane źródło pokarmu należy dodać przed wzbogaceniem osadu badaną substancją chemiczną lub w jego trakcie. Wybrane źródło pokarmu powinno umożliwić uzyskanie co najmniej dopuszczalnego poziomu rozmnażania w próbach kontrolnych. Wykonanie badania osadu sztucznego lub jego składników na obecność mikrozanieczyszczeń przed ich zastosowaniem może dostarczyć użytecznych informacji. W dodatku 4 opisano przykładowy sposób przygotowania osadu preparowanego. Dopuszczalne jest także mieszanie suchych składników, o ile wykaże się, że po dodaniu wody nadosadowej składniki osadu nie rozdzielają się (np. cząstki

torfu nie unoszą się na powierzchni wody) oraz że torf lub osad został poddany dostatecznemu kondycjonowaniu (zob. również pkt 25 i dodatek 4). Osad sztuczny należy scharakteryzować co najmniej pod względem pochodzenia składników, rozkładu wielkości ziaren (procent piasku, iłu i gliny), zawartości całkowitego węgla organicznego, zawartości wody i odczynu pH. Pomiar potencjału redoks jest nieobowiązkowy.

25. W miarę potrzeby, np. do celów związanych z konkretnymi badaniami, naturalne osady z niezanieczyszczonych obszarów mogą również służyć za osad do badań lub hodowli (3). Jeżeli jednak wykorzystuje się osad naturalny, to nie powinien zawierać zanieczyszczeń ani innych organizmów, które mogłyby konkurować z organizmami używanymi do badania lub żerować na tych organizmach, i należy go scharakteryzować, podając co najmniej pochodzenie (miejsce pobrania), pH i zawartość amoniaku w wodzie porowej, zawartość całkowitego węgla organicznego, rozkład wielkości cząstek (procent piasku, iłu i gliny) oraz procentową zawartość wody (7). Pomiar potencjału redoks i pojemności wymiany kationów jest nieobowiązkowy. Zaleca się także, aby przed jego wzbogaceniem badaną substancją chemiczną naturalny osad był przez siedem dni kondycjonowany w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania. Na koniec okresu kondycjonowania należy zebrać i wylać warstwę wody nadosadowej.
26. Jakość użytego osadu powinna umożliwiać przeżycie oraz rozmnażanie organizmów kontrolnych w okresie narażenia, przy czym takie organizmy nie powinny charakteryzować się nietypowym wyglądem ani zachowaniem. Organizmy kontrolne powinny zakopać się w osadzie i pobierać go wraz z pokarmem. Rozmnażanie w próbach kontrolnych powinno odbywać się co najmniej zgodnie z kryterium ważności opisanym w pkt 13. Obecność lub brak na powierzchni osadu odchodów, które wskazują, że organizmy spożywają osad, należy odnotować w sprawozdaniu, co może być pomocne przy interpretacji wyników badania dotyczących dróg narażenia. Dodatkowe informacje na temat przyjmowania osadu można uzyskać, stosując metody opisane w pozycjach bibliografii (24), (25), (44) i (45), w których opisano procesy przyjmowania osadu lub wyboru cząstek przez organizmy użyte do badania.
27. Procedury manipulacji dotyczące osadów naturalnych przed ich zastosowaniem w laboratorium opisano w pozycjach (3), (7) i (12). Informacje na temat przygotowywania i przechowywania osadu sztucznego zalecanego do stosowania w badaniach z wykorzystaniem *Lumbriculus* przedstawiono w dodatku 4.

Zastosowanie badanej substancji chemicznej

28. Osad wzbogaca się badaną substancją chemiczną. Ponieważ oczekuje się, że większość badanych substancji chemicznych charakteryzuje się niską rozpuszczalnością w wodzie, w celu przygotowania roztworu podstawowego w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym (np. acetonie, n-heksanie, cykloheksanie) należy rozpuszczać jak najmniejsze objętości tych substancji. W celu przygotowania roztworów do badań roztwór podstawowy rozcieńcza się przy użyciu tego samego rozpuszczalnika. Toksyczność i lotność rozpuszczalnika oraz rozpuszczalność danej badanej substancji chemicznej w wybranym rozpuszczalniku powinny stanowić główne kryteria wyboru odpowiedniego środka rozpuszczającego. W przypadku każdego poziomu stężenia należy stosować tę samą objętość odpowiedniego roztworu. Należy wzbogacić całą objętość osadu w odniesieniu do każdego poziomu stężenia, aby zminimalizować zmienność stężenia badanej substancji chemicznej między kontrpróbami. Każdy roztwór do badań następnie miesza się z piaskiem kwarcowym, jak opisano w pkt 22 (przykładowo dodaje się 10 g piasku kwarcowego na naczynie badawcze). Aby całkowicie nasączyć piasek kwarcowy, na każdy gram piasku wystarczy dodać 0,20–0,25 ml roztworu. Następnie rozpuszczalnik należy odparować do sucha. Aby zminimalizować straty badanej substancji chemicznej w wyniku łącznego parowania (np. w zależności od prężności pary danej substancji chemicznej), powleczony substancją piasek należy użyć natychmiast po osuszeniu. Suchy piasek miesza się z odpowiednią ilością osadu preparowanego o właściwym poziomie stężenia. Należy mieć na uwadze, że przy preparowaniu osadu należy uwzględnić piasek zawarty w mieszaninie badanej substancji chemicznej i piasku (zatem osad należy przygotować z mniejszą ilością piasku). Największą zaletą tej procedury jest to, że do osadu praktycznie nie wprowadza się rozpuszczalnika (7). Ewentualnie, na przykład w przypadku osadów pobranych w terenie, badaną substancję chemiczną można dodać poprzez wzbogacanie osuszonej i drobno zmielonej części osadu, zgodnie z opisem dotyczącym piasku kwarcowego przedstawionym powyżej, lub poprzez wmieszanie badanej substancji chemicznej do mokrego osadu, a następnie przeprowadzić etap odparowania, jeśli zastosowano środek rozpuszczający. Należy dopilnować, by badana substancja chemiczna dodana do osadu została w nim starannie i równomiernie rozprowadzona. W razie potrzeby dla określenia jednorodności mieszanki można przeanalizować podpróbki w celu potwierdzenia docelowych poziomów stężenia w osadzie oraz w celu określenia stopnia jednorodności. Użyteczne może również być przeprowadzenie analizy podpróbek roztworu do badań w celu potwierdzenia docelowych poziomów stężeń w osadzie. Ponieważ do celów powlekania piasku kwarcowego warstwą badanej substancji chemicznej używa się rozpuszczalnika, należy wykorzystać próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem, którą przygotowuje się, dodając tyle samo rozpuszczalnika co badanych osadów. Metodę zastosowaną do wzbogacania oraz uzasadnienie wyboru określonej procedury wzbogacania, innej niż procedury opisanej powyżej, należy przedstawić w sprawozdaniu. Metodę wzbogacania można dostosować do właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, np. aby uniknąć strat w wyniku ulatniania się podczas wzbogacania lub wyrównywania stężeń. Dodatkowe wytyczne dotyczące procedur wzbogacania przedstawiono w Environment Canada (1995) (46).

29. Po przygotowaniu wzbogaconego osadu, rozproszaniu go do naczyń badawczych z kontrpróbą i zalaniu wodą do badania, należałoby umożliwić rozdzielanie badanej substancji chemicznej między fazę wodną i osad (np. (3), (7), (9)). W miarę możliwości powinno się to odbywać w tych samych warunkach temperatury i napowietrzenia, jakie zastosowano na potrzeby badania. Czas wyrównania stężeń zależy od osadu i substancji chemicznych, i może być rzędu kilku godzin lub kilku dni, a w rzadkich przypadkach trwać do kilku tygodni (4–5 tygodni) (np. (27), (47)). W badaniu tym nie oczekuje się osiągnięcia stanu wyrównania stężeń, lecz zaleca się stosowanie okresu wyrównania stężeń trwającego od 48 godzin do 7 dni. W związku z tym czas wystarczający dla degradacji badanej substancji chemicznej będzie ograniczony do minimum. W zależności od celu badania, na przykład jeśli dąży się do odtworzenia warunków otoczenia, wzbogacony osad może być stabilizowany lub »postarzany« przez dłuższy okres.
30. Na koniec tego okresu wyrównania stężeń należy pobrać próbki co najmniej wody nadosadowej i całej objętości osadu co najmniej przy najwyższym stężeniu i przy niższym stężeniu do celów wykonania analizy stężenia badanej substancji chemicznej. Takie oznaczenia analityczne badanej substancji chemicznej powinny umożliwić obliczenie bilansu masy i wyrażenie wyników w oparciu o zmierzone stężenia początkowe. Na ogół pobieranie próbek zakłóca lub niszczy układ osad-woda. W związku z tym stosowanie tych samych kontrprób w celu pobrania próbek osadu i osobników jest na ogół niemożliwe. Należy przygotować dodatkowe naczynia do analizy o odpowiednich wymiarach, które są traktowane w ten sam sposób (łącznie z obecnością organizmów użytych do badania), lecz nie są wykorzystywane do obserwacji biologicznych. Wymiary naczyń należy dobrać tak, aby pozwoliły na uzyskanie odpowiedniej liczby próbek wymaganych w tej metodzie analitycznej. Informacje szczegółowe na temat pobierania próbek przedstawiono w pkt 53.

WYKONANIE BADANIA

Badanie wstępne

31. Jeżeli brakuje informacji na temat toksyczności badanej substancji chemicznej dla *Lumbriculus variegatus*, użyteczne może być wykonanie wstępnego doświadczenia w celu określenia zakresu stężeń, które należy zbadać w ostatecznym badaniu, oraz zoptymalizowania warunków dla wykonania badania ostatecznego. W tym celu stosuje się szereg roztworów o znacznie różniących się od siebie stężeniach badanej substancji chemicznej. Osobniki poddaje się narażeniu na każde stężenie badanej substancji chemicznej przez okres (np. 28 dni, jak w przypadku badania ostatecznego), pozwalający oszacować odpowiednie badane stężenie; kontrpróby nie są wymagane. Zachowanie osobników, na przykład unikanie osadu, co może być spowodowane przez badaną substancję chemiczną lub sam osad, należy obserwować i notować podczas badania wstępnego. W badaniu wstępnym nie należy badać stężeń przekraczających 1 000 mg/kg suchej masy osadu.

Badanie ostateczne

32. W badaniu ostatecznym stosuje się i wybiera co najmniej pięć stężeń, np. na podstawie wyników uzyskanych we wstępnym badaniu ustalającym zakres (pkt 31) oraz zgodnie z opisem przedstawionym w pkt 35, 36, 37 i 38.
33. Oprócz serii badanej należy przygotować jedną próbę kontrolną (aby uzyskać informacje na temat powtórzeń, zob. pkt 36, 37 i 38), zawierającą wszystkie składniki, z wyjątkiem badanej substancji chemicznej. Jeżeli wykorzystuje się środek rozpuszczający w celu zastosowania badanej substancji chemicznej, nie powinien on mieć znacznego wpływu na organizmy użyte do badania, jak wykazano w dodatkowej próbie kontrolnej zawierającej wyłącznie rozpuszczalnik.

Projekt badania

34. Projekt badania obejmuje dobór liczby badanych stężeń i ich zróżnicowanie, liczby naczyń zawierających dane stężenie substancji i liczby osobników na jedno naczynie. W pkt 35, 36, 37 i 38 opisano projekty dotyczące oszacowania wartości EC_x i NOEC oraz wykonania badania granicznego.
35. Stężenie efektywne (np. EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}) i zakres stężeń, powyżej którego skutki działania badanej substancji chemicznej stają się przedmiotem zainteresowania, należy umieścić między wartościami stężeń objętych badaniem. Należy unikać ekstrapolowania wyników uzyskanych znacznie poniżej najniższego stężenia, przy którym obserwuje się zmiany mające wpływ na organizmy użyte do badania, lub powyżej najwyższego badanego stężenia. Jeżeli – w wyjątkowych przypadkach – dokonano takiej ekstrapolacji, w sprawozdaniu należy przedstawić pełne uzasadnienie.

36. Jeśli ma być oszacowane EC_{50} , należy zbadać co najmniej pięć stężeń i wykonać przynajmniej trzy kontrpróby dla każdego stężenia; zaleca się wykonanie sześciu kontrprób dla próby kontrolnej lub – jeżeli jest wykorzystywana – próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem w celu poprawy szacunków zmienności w próbach kontrolnych. W każdym przypadku zaleca się stosowanie dostatecznych badanych stężeń, aby umożliwić dobre oszacowanie parametrów modelu. Odstępy między stężeniami nie powinny być większe niż ich dwukrotność (z wyjątkiem przypadków, gdy krzywa zależności stężenie-odpowiedź ma łagodne nachylenie). Liczba kontrprób dla każdej grupy badanej może być zmniejszona, jeśli zwiększy się liczbę badanych stężeń dających odpowiedzi mieszczące się w zakresie 5-95 %. Zwiększanie liczby kontrprób lub zmniejszanie wielkości odstępów między badanymi stężeniami zwykle prowadzi do zawężenia przedziałów ufności dla danego badania.
37. Jeśli celem jest oszacowanie wartości LOEC/NOEC, należy zastosować co najmniej pięć badanych stężeń z co najmniej czterema kontrpróbami (zaleca się wykonanie sześciu kontrprób dla próby kontrolnej lub – jeżeli jest wykorzystywana – próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem w celu poprawy szacunków zmienności w próbach kontrolnych), a współczynnik rozstawienia stężeń nie powinien przekraczać dwóch. Pewne informacje dotyczące mocy statystycznej zebrane podczas testowania hipotezy w badaniu międzylaboratoryjnym metody badawczej znajdują się w dodatku 6.
38. Jeśli nie oczekuje się żadnych zmian aż do 1 000 mg/kg suchej masy osadu (np. w wyniku wstępnego badania ustalającego zakres) lub jeżeli wykonanie badania przy jednym stężeniu będzie odpowiednie, aby potwierdzić wartość NOEC będącą przedmiotem zainteresowania, można wykonać badanie graniczne (stosując jedno badane stężenie i próby kontrolne). W tym drugim przypadku szczegółowe uzasadnienie wyboru stężenia granicznego należy włączyć do sprawozdania z badania. Celem badania granicznego jest wykonanie badania przy dostatecznie wysokim stężeniu, by umożliwić decydom wykluczenie ewentualnych skutków toksycznych danej substancji chemicznej, a granicę ustala się na poziomie stężenia, co do którego nie przewiduje się, by mogło kiedykolwiek wystąpić. Zaleca się stężenie 1 000 mg/kg (w przeliczeniu na suchą masę). Zazwyczaj koniecznych jest co najmniej sześć kontrprób zarówno dla próby badanej, jak i dla prób kontrolnych. Pewne informacje dotyczące mocy statystycznej zebrane podczas testowania hipotezy w badaniu międzylaboratoryjnym metody badawczej znajdują się w dodatku 6.

Warunki narażenia

Organizmy użyte do badania

39. Badanie wykonuje się, używając co najmniej 10 organizmów na każdą kontrpróbę stosowaną w celu określenia parametrów biologicznych. Wskazana liczba organizmów odpowiada około 50–100 mg mokrej biomasy. Przyjmując, że zawartość suchej masy wynosi 17,1 % (48), można uzyskać około 9–17 mg suchej biomasy na jedno naczynie. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (U.S.EPA) (2000 (7)) zaleca stosowanie wskaźnika obciążenia nieprzekraczającego 1:50 (stosunek suchej biomasy do zawartości całkowitego węgla organicznego). W przypadku osadu preparowanego, który opisano w pkt 22, odpowiada to około 43 g osadu (w przeliczeniu na suchą masę) na 10 osobników przy zawartości całkowitego węgla organicznego na poziomie 2,0 % suchego osadu. W przypadkach, w których wykorzystuje się więcej niż 10 osobników na jedno naczynie, należy odpowiednio dostosować ilość osadu i nadosadowej.
40. Wszystkie osobniki wykorzystane w konkretnym badaniu powinny pochodzić z tego samego źródła i powinny być w podobnym stanie fizjologicznym (zob. dodatek 5). Należy dobrać osobniki o podobnej wielkości (zob. pkt 39). Zaleca się zważenie podpróbki partii osobników przed rozpoczęciem badania w celu ustalenia średniej masy.
41. Osobniki, które mają zostać wykorzystane do badania, usuwa się z hodowli (aby uzyskać szczegółowe informacje, zob. dodatek 5). Duże (dorosłe) osobniki bez oznak niedawnej fragmentacji przenosi się do szklanych naczyń (np. szalek Petriego) zawierających czystą wodę. Następnie synchronizuje się je, jak opisano w dodatku 5. Po regeneracji trwającej 10–14 dni do celów badania należy wykorzystać nienaruszone i kompletne organizmy podobnej wielkości, które po zastosowaniu delikatnych bodźców mechanicznych aktywnie pływają lub pełzają. Jeśli warunki badania różnią się od warunków hodowli (np. temperatura, warunki oświetlenia i woda nadosadowa), etap aklimatyzacji trwający np. 24 godziny, przy zastosowaniu takich samych warunków w zakresie temperatury, oświetlenia i wody nadosadowej jak w badaniu, powinien być wystarczający, aby osobniki dostosowały się do warunków badania. Przystosowane skąposzczety należy losowo umieścić w naczyniach badawczych.

Karmienie

42. Ponieważ pokarm dodaje się do osadu przed zastosowaniem badanej substancji chemicznej (lub w trakcie jej podawania), osobniki nie są dodatkowo karmione w trakcie badania.

Światło i temperatura

43. Fotoperiod w hodowli komórek i w badaniu zwykle wynosi 16 godzin (3), (7). Należy utrzymywać niskie natężenie światła (np. 100–500 lx), aby imitować warunki naturalne na powierzchni osadu, a także należy dokonywać jego pomiarów co najmniej raz w ciągu okresu narażenia. Temperatura powinna wynosić $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez cały czas trwania badania. W ciągu jednego dnia pomiarów różnica temperatury między naczyniami badawczymi nie powinna być wyższa niż $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Naczynia badawcze należy umieścić w sposób losowy w inkubatorze do badań lub w obszarze badania, np. w celu zminimalizowania błędu systematycznego rozrodczości wynikającego z lokalizacji naczyń.

Napowietrzanie

44. Woda nadosadowa w naczyniu badawczym powinna być delikatnie napowietrzana (np. 2–4 pęcherzyki powietrza na sekundę) przez pipetę Pasteura, której koniec znajduje się około 2 cm powyżej powierzchni osadu w celu zminimalizowania zakłóceń osadu. Należy dopilnować, aby stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadło poniżej 30 % wartości nasycenia powietrzem (ASV). Należy kontrolować dopływ powietrza i w razie potrzeby regulować co najmniej raz dziennie w dni robocze.

Pomiary jakości wody

45. Należy wykonać pomiary następujących parametrów jakości wody w wodzie nadosadowej:

Temperatura:	co najmniej w jednym naczyniu badawczym na każdym poziomie stężenia i w jednym naczyniu badawczym prób kontrolnych raz na tydzień oraz na początku i na końcu okresu narażenia; w miarę możliwości można dodatkowo zapisywać temperaturę otaczającego środowiska (powietrze atmosferyczne lub łaźnia wodna), np. w odstępach co godzinę
Zawartość rozpuszczonego tlenu:	co najmniej w jednym naczyniu badawczym na każdym poziomie stężenia i w jednym naczyniu badawczym prób kontrolnych raz na tydzień oraz na początku i na końcu okresu narażenia; wyrażona w mg/l i jako % ASV (wartość nasycenia powietrzem)
Dopływ powietrza:	należy kontrolować co najmniej raz dziennie w dni robocze i w razie potrzeby wyregulować
pH:	co najmniej w jednym naczyniu badawczym na każdym poziomie stężenia i w jednym naczyniu badawczym prób kontrolnych raz na tydzień oraz na początku i na końcu okresu narażenia
Całkowita twardość wody:	co najmniej w jednej kontrpróbie prób kontrolnych i w jednym naczyniu badawczym przy najwyższym stężeniu, na początku i na końcu okresu narażenia; wyrażona w mg/l CaCO_3
Całkowita zawartość amoniaku:	co najmniej w jednej kontrpróbie prób kontrolnych i w jednym naczyniu badawczym przy każdym poziomie stężenia na początku i na końcu okresu narażenia, kolejno 3 razy w tygodniu; wyrażona w mg/l NH_4^+ lub NH_3 lub jako całkowity azot w postaci amoniaku.

Jeżeli pomiary parametrów jakości wody wymagają usunięcia znaczących próbek wody z naczyń, zaleca się założenie oddzielnych naczyń do wykonywania pomiarów parametrów jakości wody, tak aby stosunek objętości wody do osadu nie uległ zmianie.

Obserwacje biologiczne

46. Podczas narażenia należy obserwować naczynia badawcze, aby ocenić wizualne różnice i zmiany w zachowaniu osobników (np. unikanie osadu, odchody widoczne na powierzchni osadu) w porównaniu z próbami kontrolnymi. Należy odnotowywać obserwacje.

47. Na końcu badania każdą kontrpróbę poddaje się badaniu (dodatkowe naczynia przeznaczone do analizy chemicznej mogą być wyłączone z badania). Należy zastosować odpowiednią metodę, aby odzyskać wszystkie osobniki z naczynia badawczego. Należy zachować ostrożność, aby wszystkie osobniki zostały odzyskane w stanie nienaruszonym. Jedną z możliwych metod jest odsiewanie osobników z osadu. Można w tym celu zastosować sito ze stali nierdzewnej o odpowiedniej wielkości oczek. Większość wody nadosadowej dekantuje się ostrożnie, a pozostały osad i wodę miesza się do uzyskania mułu, który można przepuścić przez sito. Jeżeli użyte zostanie sito o wielkości oczek 500 μm , większość cząstek osadu bardzo szybko przejdzie przez sito; proces przesiewania powinien jednak przebiegać szybko, aby uniemożliwić osobnikom pękanie w kierunku oczek sita lub przez nie. Zastosowanie sita o wielkości oczek 250 μm uniemożliwi osobnikom wpłynięcie w oczka sita lub przecięnięcie się lub przez nie; należy jednak uważać, aby na sicie pozostało jak najmniej cząstek osadu. Przesiany muł z każdego naczynia z kontrpróbą można powtórnie przesiać w celu zapewnienia odzysku wszystkich osobników. Alternatywną metodę może stanowić ogrzanie osadu przez umieszczenie naczynia badawczego w łaźni wodnej o temperaturze 50–60 °C; osobniki opuszczają roztwór i mogą zostać zebrane z powierzchni osadu za pomocą szerokiej pipety z krawędziami wylotu nadtopionymi nad ogniem. Kolejna możliwa metoda może mieć na celu wytworzenie mułu z osadu i przelanie go do płytkiej szalki o odpowiednim rozmiarze. Osobniki można wyjąć z płytkiej warstwy mułu za pomocą stalowej igły lub pęsety zegarmistrzowskiej (użytej jako widelec, a nie szczypczyki, aby uniknąć uszkodzenia osobników) i przenieść do czystej wody. Po oddzieleniu osobników od mułu osadu opłukuje się je w płynie użytym w badaniu i liczy.
48. Niezależnie od stosowanej metody, laboratoria powinny wykazać, że ich personel jest w stanie odzyskać średnio co najmniej 90 % organizmów z całego osadu. Na przykład do osadu z próby kontrolnej lub do osadu użytego do badania można dodać pewną liczbę organizmów użytych do badania, odzysk może być określony po upływie jednej godziny (7).
49. Należy odnotować i poddać ocenie całkowitą liczbę żywych i martwych osobników w przeliczeniu na kontrpróbę. Następujące grupy osobników uznaje się za martwe:
- a) brak reakcji na delikatne bodźce mechaniczne;
 - b) widoczne są oznaki rozkładu (w połączeniu z punktem »a«);
 - c) szereg brakujących osobników.
- Ponadto żywe osobniki można przypisać do jednej z trzech grup:
- a) duże kompletne osobniki (dorosłe) bez zregenerowanych obszarów ciała;
 - b) kompletne osobniki ze zregenerowanymi obszarami ciała o jaśniejszym kolorze (tj. z nowymi tylnymi częściami, z nowymi przednimi częściami lub z nowymi tylnymi i przednimi częściami);
 - c) niekompletne osobniki (tj. takie, które przeszły fragmentację, a obszary ich ciała nie zregenerowały się).
- Te dodatkowe obserwacje nie są obowiązkowe, ale można je wykorzystać przy dodatkowej interpretacji wyników biologicznych (np. duża liczba osobników przypisanych do grupy c) może wskazywać na opóźnienie w rozmnażaniu lub regeneracji w ramach danego zabiegu). Ponadto jeżeli zaobserwowane zostaną jakiegokolwiek różnice w wyglądzie (np. uszkodzenia integumentu, obrzęknięte części ciała) między badanymi osobnikami a osobnikami z próby kontrolnej, fakt ten należy odnotować.
50. Bezpośrednio po policzeniu/dokonaniu oceny, żywe osobniki znalezione w każdej kontrpróbie przenosi się do suchych, uprzednio zważonych i oznakowanych zważonych szalek (jedna na kontrpróbę), a następnie uśmierca, stosując kroplę etanolu na zważoną szalkę. Zważone szalki umieszcza się w piecu suszarniczym w temperaturze 100 ± 5 °C i poddaje całonocnemu suszeniu, po którym ochładza się je w eksykatorze, a następnie waży i określa suchą masę osobnika (najlepiej w gramach z dokładnością co najmniej do czwartego miejsca po przecinku).
51. Oprócz całkowitej suchej masy można określić suchą masę bez popiołu, zgodnie z pozycją bibliograficzną (49), aby uwzględnić elementy nieorganiczne pochodzące ze spożytego osadu obecnego w przewodzie pokarmowym osobników.
52. Biomasa określa się jako całkowitą biomasę na kontrpróbę obejmującą osobniki dorosłe i młode. Martwych osobników nie uwzględnia się przy określaniu biomasy na kontrpróbę.

Weryfikacja stężeń badanej substancji chemicznej

Pobieranie próbek

53. Próbkę badanej substancji chemicznej przeznaczoną do analizy chemicznej należy pobrać co najmniej w najwyższym i najniższym stężeniu, co najmniej na koniec etapu ustalenia stanu równowagi (przed dodaniem organizmów użytych do badania) oraz na koniec badania. Do analizy należy pobrać co najmniej całą objętość osadu i wody nadosadowej. Należy pobrać co najmniej dwie próbki na matrycę i zabieg w każdym dniu pobierania próbek. Jedną z dwóch próbek można przechowywać jako rezerwę (do analizy np. w przypadku gdy wstępna analiza wykracza poza zakres $\pm 20\%$ od stężenia nominalnego). W przypadku szczególnych właściwości chemicznych, np. jeżeli spodziewana jest szybka degradacja badanej substancji chemicznej, można dopracować schemat analityczny (np. zwiększyć częstotliwość pobierania próbek, poddać analizie więcej poziomów stężeń) na podstawie swojej najlepszej wiedzy. Probki można wówczas pobierać w dni pośredniego pobierania próbek (np. siódmego dnia od rozpoczęcia narażenia).
54. Wodę nadosadową należy pobrać, ostrożnie ją dekantując lub syfonując, aby zminimalizować zakłócenia osadu. Należy odnotować objętość próbek.
55. Po usunięciu wody nadosadowej osad należy poddać homogenizacji i przenieść do odpowiedniego pojemnika. Należy odnotować masę próbki mokrego osadu.
56. Jeżeli dodatkowo wymagana jest analiza badanej substancji chemicznej w wodzie porowej, zważone próbki osadu poddane homogenizacji należy odwirować, aby otrzymać wodę porową. Na przykład około 200 ml mokrego osadu można przelać do 250 ml zlewki do odwirowywania. Następnie próbki należy odwirować bez filtrowania w celu wyodrębnienia wody porowej, np. na poziomie $10\,000 \pm 600 \times g$ przez 30–60 min w temperaturze nieprzekraczającej temperatury stosowanej w badaniu. Po odwirowaniu supernatant dekantuje się lub wprowadza się go za pomocą pipety, uważając, aby nie zassać żadnych cząstek osadu, oraz odnotowuje się jego objętość. Odnotowuje się masę pozostałego osadu. Może to ułatwić oszacowanie bilansu masy lub odzysku badanej substancji chemicznej w układzie woda-osad, jeżeli suchą masę osadu określa się w każdym dniu pobierania próbek. W niektórych przypadkach analiza stężeń w wodzie porowej może być uniemożliwiona ze względu na zbyt małą próbkę.
57. Jeżeli analiza nie zostanie wykonana bezzwłocznie, wszystkie próbki należy przechowywać w odpowiedni sposób, np. zgodnie z warunkami dotyczącymi przechowywania, zalecanymi w celu zminimalizowania degradacji określonej badanej substancji chemicznej (np. próbki środowiskowe zwykle przechowuje się w temperaturze $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ bez dostępu światła). Przed rozpoczęciem badania należy uzyskać informacje na temat właściwych warunków przechowywania określonej badanej substancji chemicznej – np. okresu trwania i temperatury przechowywania, procedur ekstrakcji itd.

Metoda analityczna

58. Ze względu na to, że cała procedura uzależniona jest zasadniczo od dokładności, precyzji i czułości metody analitycznej wykorzystywanej w odniesieniu do badanej substancji chemicznej, należy sprawdzić doświadczalnie, czy precyzja oraz odtwarzalność analizy chemicznej, a także odzyskiwanie badanej substancji chemicznej z wody i z próbek osadu, są zadowalające w przypadku danej metody co najmniej na poziomie najniższego i najwyższego badanego stężenia. Należy także sprawdzić, czy badana substancja chemiczna nie jest wykrywalna w komorach z próbą kontrolną w stężeniach wyższych niż granica oznaczalności. W razie potrzeby należy skorygować stężenie nominalne w odniesieniu do odzysku dobrej jakości substancji użytych do wzbogacenia prób kontrolnych (np. w przypadku gdy odzysk nie mieści się w przedziale 80–120 % wzbogaconej ilości). Przez cały okres trwania badania ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się w taki sposób, aby zminimalizować ich zanieczyszczenie i straty (np. wynikające z adsorpcji badanej substancji chemicznej na przyrządzie do pobierania próbek).
59. Odzysk badanej substancji chemicznej, granica oznaczalności i granica wykrywalności w osadzie i wodzie powinny być odnotowane i zgłoszone.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

60. Biomasa i całkowita liczba osobników na kontrpróbę stanowią główne obowiązkowe zmienne zależne badania, które należy ocenić pod względem statystycznym. Ocenie można również poddać, nieobowiązkowo, rozrodczość (jako wzrost liczby osobników) oraz wzrost (jako zwiększenie suchej biomasy). W takim przypadku szacowaną suchą masę osobników w momencie rozpoczęcia narażenia należy otrzymać np. z pomiarów suchej masy typowej podpróbki partii zsynchronizowanych organizmów użytych w badaniu.

61. Chociaż śmiertelność nie stanowi punktu końcowego tego badania, należy w miarę możliwości poddać ją ocenie. Aby oszacować skalę śmiertelności, szereg osobników, które nie reagują na delikatne bodźce mechaniczne lub wykazują widoczne oznaki rozkładu, oraz brakujące osobniki należy uznać za martwe. Śmiertelność należy przynajmniej odnotować i uwzględnić przy interpretacji wyników badania.
62. Stężenia powodujące zmiany należy wyrażać w mg/kg suchej masy osadu. Jeżeli odzysk badanej substancji chemicznej mierzonej w osadzie lub osadzie i wodzie nadosadowej w momencie rozpoczęcia narażenia wynosi 80–120 % stężenia nominalnego, stężenia powodujące zmiany (EC_x , NOEC, LOEC) można wyrazić w oparciu o stężenia nominalne. Jeżeli odzysk odbiega od stężeń nominalnych o więcej niż ± 20 % wartości stężeń nominalnych, stężenia powodujące zmiany (EC_x , NOEC, LOEC) powinny opierać się na stężeniach zmierzonych na początku narażenia, np. z uwzględnieniem bilansu masy badanej substancji chemicznej w układzie badawczym (zob. pkt 30). W takich przypadkach dodatkowe informacje można otrzymać dzięki analizie roztworu podstawowego lub zastosowanych roztworów, aby potwierdzić, że badane osady przygotowano poprawnie.

EC_x

63. Wartości EC_x w odniesieniu do parametrów określonych w pkt 60 oblicza się za pomocą odpowiednich metod statystycznych (np. analizy probitowej, krzywej logistycznej, funkcji Weibulla, metody Spearmana-Kärbera lub prostej interpolacji). Wytyczne dotyczące oceny statystycznej znajdują się w pozycjach bibliograficznych (15) i (50). EC_x otrzymuje się, wstawiając wartość odpowiadającą x % średniej grupy kontrolnej do wybranego równania. Aby obliczyć EC_{50} lub każdą inną wartość EC_x , należy przeprowadzić analizę regresyjną średnich ($\bar{X}$) z okresu przed wprowadzeniem substancji chemicznej.

NOEC/LOEC

64. Jeżeli analiza statystyczna ma na celu wyznaczenie NOEC/LOEC, niezbędne są dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń (poszczególne naczynia uznaje się za kontrpróby). Należy zastosować odpowiednie metody statystyczne. Ogólnie rzecz biorąc, niekorzystne skutki podania badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną bada się, stosując test jednostronnej (mniejszej) hipotezy na poziomie $p \leq 0,05$. Przykłady znajdują się w kolejnych punktach. Wytyczne dotyczące wyboru odpowiednich metod statystycznych określono w pozycjach bibliograficznych (15) i (50).
65. Normalny rozkład danych można zbadać np. za pomocą testu zgodności Kołmogorowa-Smirnowa, testu stosunku zakresu do standardowego odchylenia (test R/s) lub testu Shapiro-Wilka (dwustronny, $p \leq 0,05$). W badaniu jednorodności wariancji można zastosować test Cochrańa, test Levene'a lub test Bartletta (dwustronny, $p \leq 0,05$). Jeżeli warunki metod parametrycznych badania (normalność, jednorodność wariancji) są spełnione, można wykonać jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) i kolejne testy wielokrotnego porównywania. Testy porównywania par (np. test t Dunnetta) lub testy regresyjne (test Williamsa) mogą być stosowane w celu obliczenia, czy istnieje znacząca różnica ($p \leq 0,05$) między próbami kontrolnymi a różnymi stężeniami badanej jednostki. W przeciwnym razie NOEC i LOEC należy określić za pomocą metod nieparametrycznych (np. za pomocą korekty Bonferroniego zgodnie z testem trendu Holma lub Jonckheere'a-Terpstra).

Badanie graniczne

66. Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne (porównanie próby kontrolnej z jedną tylko próbą poddaną zabiegowi) i spełnione zostały warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur badania (normalność, jednorodność), odpowiedzi metryczne (całkowita liczba osobników oraz biomasa jako sucha masa osobników) można ocenić za pomocą testu t-Studenta. Jeżeli warunki te nie zostały spełnione, można zastosować test t-Studenta (test t-Welcha) dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, taki jak test Manna-Whitneya. Informacje dotyczące mocy statystycznej zebrane podczas testowania hipotezy w badaniu międzylaboratoryjnym metody znajdują się w dodatku 6.
67. Aby określić znaczące różnice między próbami kontrolnymi (próbą kontrolną i próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem), można wykonać badanie kontrprób każdej próby kontrolnej zgodnie z opisem dotyczącym badania granicznego. Jeżeli w wyniku tych badań nie zostaną wykryte znaczące różnice, wszystkie próby kontrolne i kontrpróby kontrolne z rozpuszczalnikiem mogą być połączone. W przeciwnym wypadku wszystkie zabiegi należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem.

Interpretacja wyników

68. Wyniki badania należy interpretować ostrożnie, jeżeli miały miejsce odstępstwa od tej metody badawczej oraz w przypadku gdy mierzone stężenia badanych roztworów występują na poziomach zbliżonych do granicy wykrywalności stosowanej metody analitycznej. Należy zwrócić uwagę na wszelkie odstępstwa od opisywanej metody badawczej.

Sprawozdanie z badania

69. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

— *Badana substancja chemiczna:*

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej (nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna, wzór strukturalny, numer CAS itp.), w tym czystość i metodę analityczną określania ilościowego badanej substancji chemicznej; źródło badanej substancji chemicznej, nazwę i stężenie wszelkich zastosowanych rozpuszczalników;
- wszelkie dostępne informacje dotyczące właściwości fizycznych i właściwości fizykochemicznych, uzyskane przed rozpoczęciem badania (np. rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, współczynnik podziału w glebie (lub w osadzie, jeśli jest dostępny), $\log K_{ow}$, stabilność w wodzie itd.).

— *Badany gatunek:*

- nazwa systematyczna, źródło, wszelkie przypadki obróbki wstępnej, aklimatyzacja, warunki hodowli itp.

— *Warunki badania:*

- zastosowana procedura badawcza (np. statyczna, półstatyczna lub przepływowa);
- projekt badania (np. liczba, materiał i wielkość komór badawczych, objętość wody na każde naczynie, masę i objętość osadu na każde naczynie, (w przypadku procedury przepływowej i półstatycznej: tempo wymiany objętości wody), napowietrzanie zastosowane przed badaniem i podczas badania, liczba kontrprób, liczba osobników w każdej kontrpróbie w momencie rozpoczęcia narażenia, liczba badanych stężeń, czas trwania etapu kondycjonowania, osiągnięcie równowagi i narażenia, częstotliwość pobierania próbek);
- głębokość warstwy osadu i warstwy wody nadosadowej;
- metoda wstępnej obróbki i wzbogacania/wprowadzenia badanej substancji chemicznej;
- badane stężenia nominalne, szczegóły dotyczące pobierania próbek do analizy chemicznej oraz metody analityczne, dzięki którym otrzymano stężenia badanej substancji chemicznej;
- charakterystyka osadu, zgodnie z pkt 24–25, oraz wszelkie inne wykonane pomiary;
- przygotowanie wody badawczej (jeśli stosowana jest woda regenerowana) i jej charakterystyka (stężenie tlenu, pH, przewodność właściwa, twardość i wszelkie inne wykonane pomiary) przed rozpoczęciem badania;
- szczegółowe informacje o karmieniu, w tym rodzaj pokarmu, przygotowanie, schemat żywienia i ilość pokarmu;
- natężenie światła i fotoperiod(-y);
- metody stosowane w celu określenia wszystkich parametrów biologicznych (np. pobieranie próbek, kontrola, ważenie organizmów użytych do badania) i wszystkich parametrów abiotycznych (np. parametry jakości wody i osadu);
- objętość lub waga wszystkich próbek do analizy chemicznej;
- szczegółowe informacje na temat opracowania wszystkich próbek przeznaczonych do analizy chemicznej, w tym szczegółowe informacje na temat procedur przygotowania, przechowywania, wzbogacania, ekstrakcji oraz procedur analitycznych (oraz precyzji) zastosowanych w odniesieniu do badanej substancji chemicznej oraz odzysk badanej substancji chemicznej.

— Wyniki:

- jakość wody w naczyniach badawczych, (pH, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, twardość, stężenia amoniaku i wszelkie inne wykonane pomiary);
- zawartość całkowitego węgla organicznego (TOC), stosunek suchej masy do mokrej masy, pH osadu i wszelkie inne wykonane pomiary;
- całkowita liczba osobników oraz, jeżeli ustalono, liczba kompletnych i niekompletnych osobników w każdej komorze badawczej na końcu badania;
- sucha masa osobników w każdej komorze badawczej na końcu badania oraz, jeżeli zmierzono, sucha masa próbek osobników na początku badania;
- wszelkie zaobserwowane nietypowe zachowania w porównaniu z próbami kontrolnymi (np. unikanie osadu, obecność lub brak odchodów);
- wszelkie zaobserwowane przypadki śmiertelności;
- oszacowanie toksycznych punktów końcowych (np. EC_{50} , NOEC lub LOEC) oraz metody statystyczne użyte w celu ich określenia;
- badane stężenia nominalne, zmierzone badane stężenia i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenie badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych;
- wszelkie odstępstwa od kryteriów ważności.

— Ocena wyników

- zgodność wyników z kryteriami ważności wymienionymi w pkt 13;
- omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Komisja Europejska (2003). Dokument ze wskazówkami technicznymi uzupełniający dyrektywę Komisji 93/67/EWG w sprawie oceny ryzyka ze strony substancji notyfikowanych, rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94 w sprawie oceny ryzyka stwarzanego przez istniejące substancje oraz dyrektywę 98/8/WE Parlamentu Europejskiego i Rady dotyczącą wprowadzania do obrotu produktów biobójczych; część I–IV. Urząd Publikacji Unii Europejskiej (Komisja Europejska), Luksemburg.
- (2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD), Paryż.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. W: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. W: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. i 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) Rozdział C.27 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconego osadu.
- (7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Wydanie 2. 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. grudzień 1997 r.
- (9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (red.), 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 listopada 1993 r., Renesse (NL).
- (10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. M. Streloke i H.Köpp (red.). Berlin 1995.
- (11) Riedhammer C. i 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. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów. E 1391-03.
- (13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. i Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. We współpracy z R. Nagelem i B. Karaoglanem. 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 23.
- (15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; piąty projekt, marzec 2003 r.; 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) Bailly H.C. i Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. s. 205–215. W J.C. Eaton, P.R. Parrish i A.C. Hendricks (red.). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów.
- (18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. i 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. i 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. i Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 12(7):1261–1266.
- (21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps i 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. i 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. i 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. i 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: 2 196–2 202.

- (25) Leppänen, M.T. i 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. i 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. i 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. i 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. i Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. W: A. Mudroch, J.M. Azcue i P. Mudroch (red.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J. i Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ¹⁴C-17 α -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59, 271–280.
- (31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann i R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, t. 20, s. 2000–2007.
- (32) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski i R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. Na zlecenie Federalnej Agencji Ochrony Środowiska (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, marzec 2000 r.
- (33) Leppänen M.T. i 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. i M. Munawar (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 235/236: 407–414.
- (35) Drewes C.D. i Fournier (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.* nr 22.
- (37) Rozdział C.1 niniejszego załącznika, Ryby, badanie toksyczności ostrej.
- (38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paryż.
- (39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. i 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 i 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. i Studinger, G. (1999). Workshop on Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes, 26–27.4.1999, Hochheim/Main, Niemcy. 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. i 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. i 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. 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. i 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. Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 54, OECD, Paryż, Francja.
- (51) Liebig M., Meller M. i 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. 24–25 marca 2004 r. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Niemcy, s. 107–119.

Dodatkowe pozycje dotyczące procedur statystycznych:

- 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* (wydanie 3), s. 19–76. Cambridge Univ. Press.
- Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. Charles Griffin & Company Ltd, Londyn.
- Hamilton M.A., R.C. Russo i R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714–719; sprostowanie: *Environ. Sci. Technol.* 12 (1978), 417.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- Sokal, R.R. i F.J. Rohlf. (1981) *Biometry. The principle and practice of statistics in biological research*. Wydanie 2. W. H. Freeman and Company. Nowy Jork.
- Miller, R.G., Jr. (1986). *Beyond ANOVA, basics of applied statistics*. John Wiley & Sons. Nowy Jork.
- Shapiro S.S. i 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.
-

Dodatek 1

Definicje

Dla celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Okres kondycjonowania stosuje się w celu ustabilizowania komponentu mikrobiologicznego osadu i usunięcia np. amoniaku pochodzącego z komponentów osadu; odbywa się przed wzbogaceniem osadu badaną substancją chemiczną. Zwykle woda nadosadowa jest usuwana po kondycjonowaniu.

EC_x jest stężeniem badanej substancji chemicznej w osadzie mającym x % wpływu (np. 50 %) na właściwości biologiczne w danym okresie narażenia.

Okres wyrównania stężeń stosuje się w celu rozprowadzenia badanej substancji chemicznej między fazą stałą, wodą porową i wodą nadosadową; odbywa się po wzbogaceniu osadu badaną substancją chemiczną i przed dodaniem organizmów użytych do badania.

Etap narażenia to czas, w trakcie którego organizmy użyte do badania poddaje się narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej.

Osad preparowany lub odtworzony, sztuczny lub syntetyczny stanowi mieszaninę materiałów używaną do symulowania składników fizycznych naturalnego osadu.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC) jest to najmniejsze badane stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym obserwuje się znaczące działanie toksyczne (przy $p \leq 0,05$) w porównaniu z próbą kontrolną. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC muszą oddziaływać w równym lub większym stopniu niż te, które są obserwowane przy LOEC. Jeżeli te dwa warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób ustalono LOEC (a następnie NOEC).

Stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) jest stężeniem badanym bezpośrednio poniżej LOEC, które w porównaniu z próbą kontrolną nie ma statystycznie istotnego skutku ($p \leq 0,05$) w danym okresie narażenia.

Współczynnik podziału oktanol-woda (K_{ow} ; czasem wyrażany również jako P_{ow}) to stosunek rozpuszczalności substancji chemicznej w n-oktanolu i wodzie w warunkach równowagi, odzwierciedlający lipofilność substancji chemicznej (rozdział A.24 niniejszego załącznika). K_{ow} lub jego logarytm K_{ow} ($\log K_{ow}$) wykorzystuje się jako wskaźnik zdolności substancji chemicznej do bioakumulacji w organizmach wodnych.

Współczynnik podziału węgiel organiczny-woda (K_{oc}) to stosunek stężenia substancji chemicznej w/na frakcji węgla organicznego osadu i stężenia substancji chemicznej w wodzie w warunkach równowagi.

Woda nadosadowa jest to woda pokrywająca osad w naczyniu badawczym.

Woda porowa jest to woda wypełniająca przestrzeń między cząstkami osadu i gleby.

Osad wzbogacony jest to osad, do którego dodano substancję chemiczną.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Skład zalecanej wody regenerowanej

(w rozumieniu rozdziału C.1 niniejszego załącznika (1))

a) *Roztwór chlorku wapnia*Rozpuścić 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ w wodzie dejonizowanej, dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.b) *Roztwór siarczanu magnezu*Rozpuścić 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w wodzie dejonizowanej, dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.c) *Roztwór wodorowęglanu sodu*Rozpuścić 2,59 g NaHCO_3 w wodzie dejonizowanej, dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.d) *Roztwór chlorku potasu*Rozpuścić 0,23 g KCl w wodzie dejonizowanej, dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

Wszystkie substancje chemiczne muszą być czyste do analizy.

Przewodność właściwa wody destylowanej lub dejonizowanej nie powinna przekraczać $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Należy wymieszać 25 ml każdego z roztworów a)–d) i dopełnić całkowitą objętość wodą dejonizowaną do 1 l. Suma jonów wapnia i magnezu w tych roztworach wynosi 2,5 mmol/l.

Stosunek jonów Ca:Mg wynosi 4:1, a jonów Na:K wynosi 10:1. Pojemność kwasowa $K_{\text{S4.3}}$ w tym roztworze wynosi 0,8 mmol/l.

Wodę rozcieńczającą należy poddać aeracji do osiągnięcia nasycenia tlenem, a następnie przechowywać ją przez około dwa dni bez dalszego napowietrzania przed zastosowaniem.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Rozdział C.1 niniejszego załącznika, Ryby, badanie toksyczności ostrej.

Dodatek 3

Właściwości fizykochemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej

Składnik	Stężenia
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 µg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	< 50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l
(dostosowano za OECD (1992)(1))	

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paryż.

Dodatek 4

Zalecany osad sztuczny – wytyczne w zakresie przygotowania i przechowywania**Składniki osadu**

Składnik	Właściwości	% suchej masy osadu
Torf	Torf sfagnowy o »średnim« stopniu rozkładu, suszony na powietrzu, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielony (wielkość cząstek $\leq 0,5$ mm)	$5 \pm 0,5$
Piasek kwarcowy	Wielkość ziaren: ≤ 2 mm, ale > 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm	75–76
Glinka kaolinowa	Zawartość kaolinitu ≥ 30 %	20 ± 1
Źródło pokarmu	Np. sproszkowana pokrzywa (<i>Folia urticae</i>), liście <i>Urtica dioica</i> (pokrzywy zwyczajnej), drobno zmielone (wielkość cząstek $\leq 0,5$ mm) zgodna z farmaceutycznymi standardami dotyczącymi spożycia przez ludzi; jako dodatek do suchego osadu	0,4–0,5 %
Węgiel organiczny	Korygowany przez dodanie torfu i piasku	$2 \pm 0,5$
Węglan wapnia	CaCO_3 , sproszkowany, chemicznie czysty, jako dodatek do suchego osadu	0,05–1
Woda dejonizowana	Przewodność właściwa ≤ 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, jako dodatek do suchego osadu	30–50

Uwaga: Jeżeli przewiduje się podwyższone stężenia amoniaku, np. jeżeli wiadomo, że badana substancja chemiczna hamuje nityfikację, użyteczne może być zastąpienie 50 % bogatej w azot sproszkowanej pokrzywy celulozą (np. chemicznie czystym proszkiem z alfa-celulozy, wielkość cząsteczek $\leq 0,5$ mm; (1) (2)).

Przygotowanie

Torf suszy się na powietrzu i mieli na drobny proszek. Zawiesinę wymaganej ilości proszku torfowego w wodzie dejonizowanej przygotowuje się za pomocą wysokosprawnego urządzenia do homogenizacji. Wartość pH zawiesiny koryguje się do poziomu $5,5 \pm 0,5$, stosując CaCO_3 . W celu ustabilizowania pH i komponentu mikrobiologicznego zawiesinę kondycjonuje się przez co najmniej dwa dni w temperaturze 20 ± 2 °C, delikatnie mieszając. Ponownie mierzy się pH, którego wartość powinna wynosić $6,0 \pm 0,5$. Następnie zawiesinę torfową miesza się z innymi składnikami (piaskiem i gliną kaolinową) oraz wodą dejonizowaną, aby otrzymać jednorodny osad o zawartości wody wynoszącej 30–50 % suchej masy osadu. Ponownie mierzy się wartość pH końcowej mieszaniny i koryguje w razie potrzeby za pomocą CaCO_3 do poziomu 6,5–7,5. Jeżeli jednak przewiduje się powstawanie amoniaku, przydatne może okazać się utrzymywanie pH w osadzie poniżej 7,0 (np. w zakresie 6,0–6,5). Próbkę osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość węgla organicznego. Jeżeli przewiduje się powstawanie amoniaku, możliwe jest kondycjonowanie osadu preparowanego przez siedem dni w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania (np. stosunek osad-woda 1: 4, wysokość warstwy osadu jak w naczyniach badawczych)

przed wzbogaceniem go badaną substancją chemiczną, tj. należy uzupełnić go wodą, która powinna zostać napowietrzona. Na koniec okresu kondycjonowania należy usunąć i odrzucić wodę nadosadową. Następnie wzbogacony piasek kwarcowy miesza się z osadem na każdym poziomie zabiegu, osad rozdziela się do naczyń badawczych do kontrprób i uzupełnia wodą do badania. Naczynia są następnie inkubowane w takich samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania. W tym momencie rozpoczyna się okres wyrównywania stężeń. Warstwa wody nadosadowej powinna być napowietrzona.

Wybrane źródło pokarmu należy dodać przed wzbogaceniem osadu badaną substancją chemiczną lub w jego trakcie. Może ona zostać zmieszana z zawiesiną torfową (zob. powyżej). Nadmiernego rozkładu źródła pokarmu przed dodaniem organizmów użytych do badań, np. w przypadku długiego okresu wyrównywania stężeń, można jednak uniknąć, zachowując jak najkrótszy okres między dodaniem pokarmu i rozpoczęciem narażenia. W celu zapewnienia wystarczającego wzbogacenia pokarmu badaną substancją chemiczną, źródło pokarmu należy wymieszać z osadem nie później niż w dniu wzbogacenia osadu badaną substancją chemiczną.

Przechowywanie

Suche składniki sztucznego osadu mogą być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu lub w temperaturze pokojowej. Przygotowany osad wzbogacony badaną substancją chemiczną należy niezwłocznie użyć do badania. Próbkę wzbogaconego osadu można, do czasu ich analizy, przechowywać w warunkach zalecanych w odniesieniu do danej badanej substancji chemicznej.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. i Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. We współpracy z R. Nagelem i B. Karaoglanem. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (2) Liebig M., Meller M. i 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. 24–25 marca 2004 r. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Niemcy, s. 107–119.

Dodatek 5

Metody hodowli *Lumbriculus variegatus*

Gatunek *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta zamieszkuje osady słodkich wód i jest powszechnie wykorzystywany w badaniach ekotoksykologicznych. Jego hodowla w warunkach laboratoryjnych jest łatwa. Poniżej podano ogólny opis metod hodowli.

Metody hodowli

Warunki hodowli w przypadku *Lumbriculus variegatus* zostały szczegółowo przedstawione w Phippsa i in. (1993) (1), Brunson i in. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Poniżej przedstawione zostało krótkie streszczenie tych warunków. Główną zaletę *L. variegatus* stanowi jego szybkie rozmnażanie się, skutkujące szybko rosnącą biomasa w populacjach hodowanych w laboratoriach (np. (1), (3), (4), (5)).

Osobniki można hodować w dużych akwariach (57–80 l) w temperaturze 23 °C przy fotoperiodzie wynoszącym 16L:8D (100–1 000 luksów), stosując codzienne odnawianą naturalną wodę (45–50 l na akwarium). Podłoże przygotowuje się poprzez pocięcie niebielonych brązowych papierowych ręczników na paski, które można następnie na kilka sekund wymieszać z wodą do hodowli, aby wytworzyć małe kawałki papierowego podłoża. Podłoża można następnie użyć bezpośrednio w akwariach do hodowli *Lumbriculus*, pokrywając dno zbiornika, lub przechowywać zamrożone w dejonizowanej wodzie do późniejszego wykorzystania. Nowe podłoże w zbiorniku zasadniczo zachowa trwałość przez około dwa miesiące.

Każdą hodowlę rozpoczyna się od 500–1 000 organizmów karmionych 10 ml zawiesiny zawierającej 6 g pokarmu przeznaczonego dla młodych pstrągów 3 razy w tygodniu w warunkach wymiany lub przepływu. W przypadku hodowli statycznych lub pół-statycznych dostarczane porcje pożywienia powinny być mniejsze, aby zapobiec rozwojowi bakterii i grzybów.

W tych warunkach liczba osobników w hodowli zasadniczo ulega podwojeniu w ciągu 10–14 dni.

Lumbriculus variegatus można ewentualnie hodować w systemach składających się z warstwy piasku kwarcowego, takiego jakiego używa się do sztucznego osadu (1–2 cm głębokości), i wody regenerowanej. Jako naczynia do hodowli wykorzystać można pojemniki wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej o wysokości 12 do 20 cm. Zbiornik z wodą należy delikatnie napowietrzać (np. 2 pęcherzyki powietrza na sekundę) przez pipetę Pasteura umieszczoną około 2 cm powyżej powierzchni osadu. Aby zapobiec gromadzeniu się np. amoniaku, wodę nadosadową należy wymieniać, stosując układ przepływowy lub manualnie co najmniej raz w tygodniu. Skąposzczety mogą być trzymane w temperaturze pokojowej z fotoperiodem wynoszącym 16 godzin światła (o natężeniu 100–1 000 luksów) i 8 godzin bez dostępu światła. W przypadku hodowli pół-statycznych (wymiana wody raz na tydzień) osobniki karmione są karmą TetraMin dwa razy na tydzień (np. 0,6–0,8 mg na cm² powierzchni osadu), która może być podawana w formie zawiesiny 50 mg TetraMinu na 1 ml wody dejonizowanej.

Lumbriculus variegatus można usuwać z hodowli, np. przesiewając podłoże na siatce o małych oczkach lub wyjmując organizmy za pomocą pipety o szerokim wylocie (około 5 mm średnicy) z krawędzią nadtopioną nad ogniem i przenosząc do oddzielnej zlewki. Jeżeli do zlewki zostało również przeniesione podłoże, zlewkę zawierającą organizmy i podłoże pozostawia się na noc w warunkach przepływu, co pozwala usunąć podłoże ze zlewki, natomiast organizmy pozostaną na dnie naczynia. Można je następnie wprowadzić do nowo przygotowanych zbiorników do hodowli lub poddać dalszej obróbce na potrzeby badania jak przedstawiono w (3) i (4) lub w dalszej części opisu.

Kwestią, do której należy podejść krytycznie w przypadku zastosowania *L. variegatus* w badaniach bioakumulacji osadu, jest sposób rozmnażania tego gatunku (architomia lub morfalaksja, np. (6)). Wynikiem takiego bezpłciowego rozmnażania są dwa fragmenty, które nie pobierają pokarmu przez pewien okres do momentu regeneracji części głowy lub ogona (np. (7)(8)). Oznacza to, że w przypadku *L. variegatus* pobieranie zanieczyszczonego osadu nie odbywa się w sposób ciągły.

W związku z tym w celu zminimalizowania niekontrolowanego rozmnażania i regeneracji oraz późniejszej dużej zmienności w wynikach badań, należy dokonać synchronizacji. Zmienność taka może mieć miejsce w przypadku gdy niektóre osobniki, które uległy fragmentacji i w związku z tym nie pobierają pokarmu przez pewien okres, są w mniejszym stopniu narażone na działanie badanej substancji niż inne osobniki, które nie uległy fragmentacji podczas badania, np. (9), (10), (11). Na 10–14 dni przed rozpoczęciem narażenia organizmy należy sztucznie podzielić (synchronizacja). W celu synchronizacji należy wybrać duże (dorosłe) osobniki, które nie wykazują oznak niedawnej morfalaksji. Organizmy te można umieścić na szklanym szkiełku w kropli wody do hodowli i rozciąć w okolicy środkowej części ciała za pomocą skalpela. Należy dopilnować, aby tylne końce były podobnej długości. Tylne końce należy następnie pozostawić w celu odtworzenia nowych głów w naczyniu do hodowli zawierającym to

samo podłoże, co wykorzystane w hodowli, i wodę regenerowaną aż do momentu rozpoczęcia narażenia. Oznaką regeneracji nowych głów jest zakopywanie się zsynchronizowanych organizmów w substracie (obecność zregenerowanych głów można potwierdzić, sprawdzając reprezentatywne podróbki pod dwu-okularowym mikroskopem). Przewiduje się, że organizmy użyte do badań będą potem w podobnym stanie fizjologicznym. Oznacza to, że jeśli podczas badania następuje rozmnażanie przez morfalaksję w przypadku zsynchronizowanych organizmów, praktycznie wszystkie zwierzęta będą w równym stopniu narażone na wzbogacony osad. Pierwsze karmienie zsynchronizowanych organizmów powinno zostać wykonane w momencie, gdy organizmy zaczną zakopywać się w podłożu lub 7 dni po rozcięciu. Schemat żywienia powinien wyglądać podobnie jak w przypadku zwykłych hodowli, ale zaleca się karmienie zsynchronizowanych organizmów tym samym źródłem pożywienia, które ma być wykorzystane w badaniu. Organizmy należy przechowywać w temperaturze badania wynoszącej 20 ± 2 °C. Po regeneracji w badaniu zastosować należy nienaruszone i kompletne osobniki, które pod wpływem delikatnych bodźców mechanicznych aktywnie pływają lub pełzają. Należy zapobiegać zranieniom lub autotomii organizmów, np. stosując do ich przenoszenia pipety z krawędziami nadtopionymi nad ogniem lub narzędzia stomatologiczne ze stali nierdzewnej.

Źródła kultur starterowych *Lumbriculus variegatus* (adresy w Stanach Zjednoczonych podane za (4))

Europa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Niemcy

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Niemcy

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finlandia

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Niemcy

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

STANY ZJEDNOCZONE AMERYKI

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

BIBLIOGRAFIA

- (1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. i 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. i 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. W: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Wydanie 2. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marzec 2000 r.
- (5) Kukkonen, J. i 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. i Fournier (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. i 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: 2 196-2 202.
- (8) Leppänen, M.T. i 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 i R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, t. 20, s. 2000-2007.
- (10) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski i R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. Na zlecenie Federalnej Agencji Ochrony Środowiska (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, marzec 2000 r.
- (11) Leppänen M.T. i 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.

Dodatek 6

Podsumowanie wyników badań międzylaboratoryjnych
»Badanie toksyczności osadu przy wykorzystaniu *Lumbriculus variegatus*«

Tabela 1

Wyniki poszczególnych serii badań międzylaboratoryjnych: średnia liczba organizmów w próbach kontrolnych i w próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem na koniec badania; SD = odchylenie standardowe; CV = współczynnik zmienności

	Średnia liczba organizmów w próbach kontrolnych	SD	CV (%)	n	Średnia liczba organizmów w próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem	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
Średnia z badań międzylaboratoryjnych	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			
maks	42,0				43,7			
CV (%)	28,1				24,7			

Tabela 2

Wyniki poszczególnych serii badań międzylaboratoryjnych: średnia całkowita sucha masa organizmów w kontrpróbie w próbach kontrolnych i w próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem na koniec badania; SD = odchylenie standardowe; CV = współczynnik zmienności

	Całkowita sucha masa organizmów w kontrpróbie (próbach kontrolnych)	SD	CV (%)	n	Całkowita sucha masa organizmów w kontrpróbie (w próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem)	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
Średnia z badań międzylaboratoryjnych	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			
maks	41,3				41,4			
CV (%)	31,3				26,8			

Tabela 3

Toksyczność PCP: podsumowanie punktów końcowych w badaniu międzylaboratoryjnym; średnia z badań międzylaboratoryjnych dla EC₅₀, NOEC i LOEC; SD = odchylenie standardowe; CV = współczynnik zmienności

Parametr biologiczny		Średnia z badań międzylaboratoryjnych (mg/kg)	min	maks	Współczynnik wyników badań międzylaboratoryjnych (mg/kg)	SD	CV (%)	średnia geometryczna (mg/kg)
całkowita liczba organizmów	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				
całkowita sucha masa organizmów	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				
śmiertelność/przeżycie	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
rozmnażanie (wzrost liczby organizmów w kontrpróbie)	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				
wzrost (wzrost biomasy na kontrpróbę)	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: minimalna wykrywalna różnica w odniesieniu do wartości prób kontrolnych podczas testowania hipotez; stosowana jako miara mocy statystycznej

BIBLIOGRAFIA

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. i Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. We współpracy z R. Nagelem i B. Karaoglanem. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

C.36 BADANIE ROZRODCZOŚCI DRAPIEŻNYCH ROZTOCZY (HYPOASPIS (GEOLAEAPS) ACULEIFER) W GLEBIE

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 226 (2008). Niniejsza metoda badawcza ma na celu dokonanie oceny wpływu działania substancji chemicznych w glebie na zdolność rozrodczą gatunków roztoczy glebowych *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), a zatem pozwala na oszacowanie zahamowania tempa wzrostu danej populacji (1,2). Zdolność rozrodcza oznacza w tym wypadku liczbę młodych osobników pod koniec okresu badania. *H. aculeifer* reprezentuje dodatkowy poziom troficzny gatunków, w odniesieniu do których dostępne są już metody badawcze. Za odpowiednie do celów niniejszej metody badawczej uważa się badanie rozrodczości bez wykluczania i określania ilościowego na poszczególnych etapach cykli reprodukcyjnych. W odniesieniu do substancji chemicznych przy których stosuje się inny scenariusz narażenia niż narażenie poprzez glebę stosowne mogą być również inne podejścia (3).
2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* uważa się za odpowiedniego przedstawiciela fauny glebowej, a w szczególności – drapieżnych roztoczy. Osobniki tego gatunku występują na całym świecie (5), można je łatwo zebrać i hodować w laboratorium. Podsumowanie biologii *H. aculeifer* przedstawiono w dodatku 7. Dostępne są podstawowe informacje dotyczące ekologii gatunków roztoczy i ich zastosowania w badaniach ekotoksykologicznych (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

ZASADA BADANIA

3. Dorosłe samice narażane są na działanie szeregu stężeń substancji chemicznej wymieszanej z glebą. Badanie rozpoczyna się na 10 dorosłych samicach przypadających na jedno naczynie z kontrpróbą. Samców nie wprowadza się do badania, gdyż jak wykazało doświadczenie, w przypadku obecności samców samice rozpoczynają rozmnażanie niezwłocznie po wyjściu ze stadium poczwarki lub niewiele później. Ponadto włączenie samców do badania przedłużyłoby przedmiotowe badanie, gdyż niezbędne stałoby się trudne do wykonania wykluczenie pewnych etapów rozwoju. Samo rozmnażanie nie stanowi zatem części badania. Samice wprowadza się do badania 28–35 dni po rozpoczęciu okresu składania jaj w synchronizacji (zob. dodatek 4), gdyż można wtedy uznać, że już zostały skojarzone z samcami, a więc przeszły etap poprzedzający etap składania jaj. W temperaturze 20 °C badanie kończy się 14. dnia po wprowadzeniu samic (dzień 0), dzięki czemu pierwsze potomstwo w próbie kontrolnej osiągnie stadium poczwarki (zob. dodatek 4). Jako główną mierzoną wartość określa się liczbę młodych osobników na naczynie badawcze i dodatkowo liczbę samic, które przeżyły. Zdolność rozrodczą roztoczy narażonych na badaną substancję chemiczną porównuje się ze zdolnością w próbach kontrolnych w celu określenia ECx (np. EC10, EC50) lub najwyższego stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) (zob. definicje w dodatku 1), w zależności od projektu badania (zob. pkt 29). Ogólny zarys harmonogramu badania przedstawiono w dodatku 8.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

4. W miarę możliwości należy znać rozpuszczalność w wodzie, $\log K_{ow}$, współczynnik podziału gleba/woda oraz prężność pary badanej substancji chemicznej. Pożądane są dodatkowe informacje na temat losów badanej substancji chemicznej w glebie, takie jak wskaźniki rozkładu biotycznego i abiotycznego.
5. Niniejszą metodą badawczą można stosować w odniesieniu do substancji chemicznych rozpuszczalnych albo nierozpuszczalnych w wodzie. Sposób zastosowania badanej substancji chemicznej będzie się jednak odpowiednio różnił. Metoda badawcza nie ma zastosowania do lotnych substancji chemicznych, np. substancji chemicznych, w odniesieniu do których stała Henry'ego lub współczynnik podziału powietrze/woda są większe niż jeden, lub substancji chemicznych, w odniesieniu do których prężność pary przekracza 0,0133 Pa w temperaturze 25 °C.

WAŻNOŚĆ BADANIA

6. Aby wynik badania był ważny, powinny być spełnione następujące kryteria dotyczące prób kontrolnych niepoddanych działaniu substancji:
 - średnia śmiertelność dorosłych samic osiągnięta na koniec badania nie powinna przekraczać 20 %;
 - średnia liczba osobników młodych w każdej kontrpróbie (do której wprowadzono 10 dorosłych samic) na koniec badania powinna wynosić co najmniej 50;
 - współczynnik zmienności obliczony w odniesieniu do liczby młodych osobników roztoczy w każdej kontrpróbie nie powinien być wyższy niż 30 % na koniec ostatecznego badania.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

7. Należy określić EC_x lub NOEC substancji chemicznej odniesienia, aby zapewnić odpowiednie warunki badania w laboratorium i sprawdzić, czy reakcja organizmów użytych do badania nie zmieniła się w czasie. Odpowiednią substancją chemiczną odniesienia, w przypadku której wykazano wpływ na rozmiar populacji, jest dimetoat (CAS 60-51-5) (4). Jako alternatywnej substancji chemicznej odniesienia można użyć kwasu borowego (CAS 10043-35-3). W przypadku tej substancji chemicznej uzyskano mniejsze doświadczenie. Możliwe są dwa warianty projektów:
- substancję chemiczną odniesienia można badać równoległe z oznaczaniem toksyczności każdej badanej substancji chemicznej o jednym stężeniu, co należy uprzednio wykazać w badaniu dawka-odpowiedź, którego wynik wyniesie > 50 % zmniejszenia liczby potomstwa. W tym wypadku liczba kontrprób powinna być taka sama jak liczba prób kontrolnych (zob. pkt 29);
 - ewentualnie substancję chemiczną odniesienia bada się 1–2 razy do roku, stosując badanie dawka-odpowiedź. W zależności od wybranego wariantu liczba stężeń i kontrprób oraz współczynnik rozstawienia stężeń są zróżnicowane (zob. pkt 29), powinno się jednak osiągnąć wynik w zakresie 10–90 % odpowiedzi (przy współczynniku rozstawienia stężeń równym 1,8). W przypadku dimetoatu EC₅₀ określone na podstawie liczby młodych osobników powinno spaść do zakresu 3,0–7,0 mg substancji aktywnej/kg gleby (suchej masy). Opierając się na uzyskanych dotychczas wynikach dotyczących kwasu borowego, EC₅₀ określone na podstawie liczby młodych osobników powinno spaść do zakresu 100–500 mg/kg suchej masy gleby.

OPIS BADANIA

Naczynia i wyposażenie używane do badania

8. Należy używać naczyń badawczych o średnicy 3–5 cm (grubość warstwy gleby ≥ 1,5 cm), wykonanych ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału i wyposażonych w dokładnie dopasowaną pokrywkę. Preferowane są pokrywki zakręcane, w którym to wypadku naczynia mogłyby być napowietrzane dwa razy na tydzień. Można ewentualnie używać osłon (np. gaza), umożliwiających bezpośrednią wymianę gazową między podłożem a atmosferą. W związku z tym, że podczas badania należy zachować wystarczająco wysoką wilgotność, istotne jest, aby w trakcie trwania badania kontrolować wagę każdego naczynia badawczego i w razie potrzeby uzupełniać wodę. Może być to szczególnie istotne, jeżeli niedostępne są pokrywki zakręcane. Jeżeli używa się nieprzezroczystego naczynia badawczego, osłona powinna być wykonana z materiału, który umożliwia dostęp światła (np. perforowana, przezroczysta osłona), jednocześnie uniemożliwiająca ucieczkę roztoczu. Wielkość i rodzaj naczynia badawczego zależy od metody ekstrakcji (szczegółowe informacje można znaleźć w dodatku 5). Jeżeli stosuje się ekstrakcję ciepłem doprowadzanym do naczynia badawczego, należy wyposażyć je w dno w postaci siatki o odpowiednich rozmiarach oczek (szczelnie zamknięte do momentu ekstrakcji), natomiast głębokość warstwy gleby powinna być na tyle duża, aby uwzględnić gradient temperatury i wilgotności.
9. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratorium, obejmujące w szczególności:
- naczynia, najlepiej wykonane ze szkła, z zakręcanymi pokrywkami;
 - suszarka szalkowa;
 - mikroskop stereoskopowy;
 - szcztotki do przenoszenia roztoczu;
 - pehametr i luksomierz;
 - odpowiednie dokładne wagi;
 - odpowiedni sprzęt do regulacji temperatury;
 - odpowiedni sprzęt do regulacji wilgotności powietrza (nie jest konieczny, jeżeli naczynia narażone na działanie substancji są przykryte pokrywkami);
 - inkubator lub małe pomieszczenie z regulacją temperatury;
 - sprzęt do przeprowadzania ekstrakcji (zob. dodatek 5) (13).
 - górny panel świetlny z regulacją światła;
 - słoje do zbierania wydobytych roztoczu.

Przygotowanie sztucznej gleby

10. W niniejszym badaniu stosuje się sztuczną glebę. Sztuczna gleba składa się z następujących składników (wszystkie wartości dotyczą suchej masy):
- 5 % torfu sfagnowego, suszonego na powietrzu i drobno zmielonego (dopuszczalna wielkość cząstek 2 ± 1 mm);
 - 20 % glinki kaolinowej (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);
 - około 74 % przemysłowego piasku suszonego na powietrzu (w zależności od potrzebnej ilości CaCO_3), głównie drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek ma wymiary 50–200 mikronów. Dokładna ilość piasku zależy od zawartości CaCO_3 (zob. poniżej), razem powinny stanowić 75 %.
 - < 1,0 % węgla wapnia (CaCO_3 , sproszkowanego, czystego do analizy), aby otrzymać pH $6,0 \pm 0,5$; ilość dodawanego węgla wapnia może zależeć przede wszystkim od jakości/charakteru torfu (zob. uwaga 1).

Uwaga 1: Ilość potrzebnego CaCO_3 będzie zależna od składników podłoża gleby i należy ją oznaczyć, dokonując bezpośrednio przed badaniem pomiaru pH podpróbek gleby (14).

Uwaga 2: Zawartość torfu w sztucznej glebie odbiega od zawartości stosowanej w innych metodach badawczych dotyczących organizmów glebowych, gdzie w większości przypadków stosuje się 10 % zawartości torfu (np. (15)). Według EPPO (16) w typowej glebie rolnej znajduje się nie więcej niż 5 % materii organicznej, zmniejszenie zawartości torfu odzwierciedla zatem mniejsze możliwości naturalnej gleby do sorpcji badanej substancji chemicznej do węgla organicznego.

Uwaga 3: W razie potrzeby, np. do celów związanych z konkretnymi badaniami, za podłoże do badań lub hodowli mogą również służyć naturalne gleby z niezanieczyszczonych obszarów. Jeżeli jednak używa się gleby naturalnej, należy określić co najmniej jej pochodzenie (miejsce pobrania), pH, teksturę (rozkład wielkości cząstek) oraz zawartość związków organicznych. Należy podać rodzaj i nazwę gleby zgodnie z klasyfikacją gleb, jeżeli są one dostępne, a sama gleba nie powinna być zanieczyszczona. W przypadku gdy badana substancja chemiczna jest metalem lub związkiem metaloorganicznym, należy również określić pojemność wymiany kationów (PWK). Ponieważ podstawowe informacje na temat gleb naturalnych są zazwyczaj trudne do uzyskania, należy zwrócić szczególną uwagę na zachowanie kryteriów ważności.

11. Suche składniki gleby dokładnie miesza się (np. w dużym mieszalniku laboratoryjnym). W celu określenia pH stosuje się mieszaninę gleby i 1-molowego roztworu chlorku potasu (KCl) lub 0,01-molowego roztworu chlorku wapnia (CaCl_2) w stosunku 1:5 (zob. (14) i dodatek 3). Jeżeli kwasowość gleby przekracza wymagany zakres (zob. pkt 10), można ją dostosować, dodając odpowiednią ilość CaCO_3 . Jeżeli gleba jest zbyt alkaliczna, można to skorygować, dodając większą ilość mieszaniny zawierającej pierwsze trzy ze składników określonych w pkt 10 z wyłączeniem CaCO_3 .
12. Maksymalną pojemność wodną sztucznej gleby ustala się zgodnie z procedurami określonymi w dodatku 2. Na dwa do siedmiu dni przed rozpoczęciem badania suchą sztuczną glebę nawilża się wstępnie, dodając odpowiednią ilość wody destylowanej lub dejonizowanej, w celu uzyskania około połowy końcowej zawartości wody, stanowiącej 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby. Zawartość wilgoci dostosowuje się, aby osiągnąć 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby, dodając roztwór badanej substancji chemicznej lub wodę destylowaną albo dejonizowaną (zob. pkt 16–18). Należy wykonać dodatkową przybliżoną ocenę zawartości wilgoci w glebie, ściskając glebę delikatnie w dłoni – jeżeli zawartość wilgoci jest odpowiednia, pomiędzy palcami powinny pojawić się małe krople wody.
13. Zawartość wilgoci w glebie określa się na początku i na końcu badania, susząc do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C zgodnie z normą ISO 11465 (17), zaś pH gleby określa się zgodnie z dodatkiem 3 lub normą ISO 10390 (14). Pomiary te powinno się przeprowadzać w dodatkowych próbkach niezawierających roztworu, zarówno na glebie pobranej z próby kontrolnej, jak i na glebie pobranej z każdego badania stężenia. Nie należy korygować pH gleby podczas badania kwasowych substancji chemicznych lub podstawowych chemikaliów. Podczas badania powinno się monitorować zawartość wilgoci, co jakiś czas ważąc naczynia (zob. pkt 20 i 24).

Wybór i przygotowanie zwierząt użytych do badania

14. Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu jest *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Do rozpoczęcia badania potrzebne są dorosłe samice roztoczy pochodzące ze zsynchronizowanej kohorty. Roztocza powinno się wprowadzić do badania ok. 7–14 dni od momentu osiągnięcia przez nie dojrzałości, 28–35 dni po rozpoczęciu składania jaj w synchronizacji (zob. pkt 3 i dodatek 4). Należy odnotować źródło pochodzenia roztoczy lub ich dostawcę, a także utrzymanie hodowli laboratoryjnej. W przypadku prowadzenia hodowli laboratoryjnej zaleca się, aby co najmniej raz do roku potwierdzać identyfikację gatunku. Formularz identyfikacji stanowi dodatek 6.

Przygotowywanie badanych stężeń

15. Badaną substancję chemiczną miesza się z glebą. Rozpuszczalniki organiczne zastosowane w celu wspomaganie podawania badanej substancji chemicznej do gleby należy wybrać na podstawie niskiej toksyczności dla roztoczy; projekt badania musi zawierać właściwą próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem (zob. pkt 29).

Badana substancja chemiczna rozpuszczalna w wodzie

16. Roztwór badanej substancji chemicznej przygotowuje się w wodzie dejonizowanej w ilości wystarczającej do wszystkich kontrprób w ramach jednego badanego stężenia. Zaleca się zastosowanie odpowiedniej ilości wody, aby osiągnąć wymaganą wilgotność, tj. 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej gleby (zob. pkt 12). Przed wprowadzeniem do naczynia badawczego każdy roztwór badanej substancji chemicznej dokładnie miesza się z jedną partią wstępnie nawilżonej gleby.

Badana substancja chemiczna nierozpuszczalna w wodzie

17. W przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w wodzie, ale rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych, badaną substancję chemiczną można rozpuścić w jak najmniejszej ilości odpowiedniego nośnika (np. acetonu). Należy stosować jedynie lotne rozpuszczalniki. W przypadku stosowania takich nośników wszystkie badane stężenia i próba kontrolna powinny zawierać tę samą minimalną ilość nośnika. Nośnik natrykuje się na niewielką ilość, na przykład 10 g, drobnego piasku kwarcowego albo miesza się go z piaskiem. Należy uwzględnić tę ilość przy ustalaniu całkowitej zawartości piasku w podłożu. Nośnik usuwa się, odparowując go przez co najmniej godzinę pod okapem wyciągowym. Tę mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do wstępnie nawilżonej gleby i dokładnie miesza, dodając odpowiednią ilość dejonizowanej wody w celu utrzymania wymaganej wilgoci. Otrzymaną mieszaninę umieszcza się w naczyniach badawczych. Należy zauważyć, że niektóre rozpuszczalniki mogą być toksyczne dla roztoczy. Zaleca się zatem zastosowanie dodatkowej próby kontrolnej z wodą bez nośnika, jeżeli toksyczność rozpuszczalnika względem roztoczy nie jest znana. Jeżeli zostanie odpowiednio udowodnione, że rozpuszczalnik (w stężeniach, które mają być zastosowane) nie wywołuje żadnych skutków, można wyeliminować grupę kontrolną z wodą.

Badana substancja chemiczna słabo rozpuszczalna w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych

18. W przypadku substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie oraz w rozpuszczalnikach organicznych ekwiwalent 2,5 g drobnego zmielonego piasku kwarcowego na jedno naczynie badawcze (na przykład 10 g drobnego piasku kwarcowego na cztery kontrpróby) miesza się z daną ilością badanej substancji chemicznej w celu otrzymania pożądanego badanego stężenia. Należy uwzględnić tę ilość przy ustalaniu całkowitej zawartości piasku w podłożu. Tę mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do wstępnie nawilżonej gleby i dokładnie miesza po dodaniu odpowiedniej ilości dejonizowanej wody w celu otrzymania wymaganej zawartości wilgoci. Otrzymaną mieszaninę przekłada się do naczyń badawczych. Procedurę tę powtarza się dla każdego badanego stężenia, a także przygotowuje się odpowiednią próbę kontrolną.

PROCEDURA

Grupy badane i kontrolne

19. W przypadku każdej próby kontrolnej i każdego naczynia zabiegowego zaleca się umieszczanie 10 dorosłych samic w 20 g suchej masy sztucznej gleby. Organizmy używane do badania powinno się dodać w przeciągu dwóch godzin po przygotowaniu końcowego podłoża używanego w badaniu (tj. po zastosowaniu badanej jednostki). W szczególnych przypadkach (np. gdy starzenie uznaje się za decydujący czynnik) czas pomiędzy przygotowaniem końcowego podłoża używanego w badaniu a dodaniem roztoczy może zostać przedłużony (szczegółowe informacje dotyczące starzenia można znaleźć w (18)). W takich wypadkach należy jednak przedstawić naukowe uzasadnienie.

20. Po dodaniu roztoczu do gleby zapewnia się im pokarm i należy również określić wagę początkową każdego naczynia badawczego, aby podczas badania można było ją wykorzystać jako wartość referencyjną do celów monitorowania zawartości wilgoci w glebie, jak określono w pkt 24. Naczynia badawcze następnie przykrywa się zgodnie z opisem w pkt 8 i umieszcza w komorze badawczej.
21. Dla każdej metody wprowadzenia badanej substancji chemicznej opisanej w pkt 15–18 przygotowuje się odpowiednie próby kontrolne. Podczas przygotowywania prób kontrolnych postępuje się zgodnie z odpowiednimi opisanymi procedurami, z tym, że nie dodaje się badanej substancji chemicznej. W związku z tym w stosownych przypadkach do prób kontrolnych wprowadza się rozpuszczalniki organiczne, piasek kwarcowy lub inne nośniki, w takich samych stężeniach/iłościach, które zastosowano podczas zabiegów. W przypadku dodania do badanej substancji chemicznej rozpuszczalnika lub innego nośnika należy również przygotować dodatkową próbę kontrolną bez nośnika lub badanej substancji chemicznej i zbadać ją, jeżeli toksyczność rozpuszczalnika nie jest znana (zob. pkt 17).

Warunki badania

22. Temperatura badania powinna wynosić 20 ± 2 °C. Temperaturę należy odnotowywać co najmniej raz dziennie i w razie potrzeby należy ją korygować. Badanie przeprowadza się w warunkach kontrolowanych cykli dzień–noc (najlepiej 16 godzin światła i 8 godzin bez dostępu światła) z natężeniem światła w okolicy naczyń badawczych na poziomie 400–800 luksów. Ze względu na kwestie porównywalności warunki te są takie same, jak w innych badaniach ekotoksykologicznych gleby (np. (15)).
23. Należy zapewnić wymianę gazową, napowietrzając naczynia badawcze co najmniej dwa razy w tygodniu w przypadku stosowania pokryw przykręcanych. Jeżeli użyto osłon z gazy, należy zwrócić szczególną uwagę na utrzymanie zawartości wilgoci w glebie (zob. pkt 8 i 24).
24. W trakcie badania zawartość wody w podłożu glebowym w naczyniach badawczych utrzymuje się za pomocą okresowego (np. raz w tygodniu) ważenia i w razie potrzeby ponownego ważenia naczyń badawczych. W razie potrzeby straty uzupełnia się wodą dejonizowaną. Zawartość wilgoci podczas badania nie powinna różnić się od początkowej zawartości wilgoci o więcej niż 10 %.

Karmienie

25. Wykazano, że odpowiednie źródło pokarmu stanowią rozkruszki drobne (*Tyrophagus putrescentiae* (Schränk, 1781 r.)). Do tego celu mogą również nadawać się małe skoczogonki (np. młode osobniki *Folsomia candida* Willem, 1902, lub *Onychiurus fimatus* (19), (20), wazonkowce (np. *Enchytraeus crypticus* Westheide i Graefe, 1992) lub nicianie (np. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) (21). Zaleca się sprawdzenie pokarmu przed wykorzystaniem go w badaniu. Rodzaj i ilość pokarmu powinny zapewnić odpowiednią liczbę osobników młodych, aby wypełnić kryteria ważności (pkt 6). Aby wybrać pożywienie, należy uwzględnić sposób działania badanej jednostki (np. akarycydy mogą być toksyczne również dla roztoczy spożywczych, zob. pkt 26).
26. Pokarm należy dostarczać bez ograniczeń (tj. za każdym razem małe porcje (na końcówce szpatułki)). W tym celu można również zastosować wentylator wyciągowy o niskim ciśnieniu ssania proponowany w badaniu skoczogonków lub cienki pędzel. Zwykle wystarczy dostarczać pokarm na początku badania i dwa do trzech razy na tydzień. Jeżeli badana jednostka okaże się toksyczna dla podawanego pokarmu, należy rozważyć zwiększenie ilości pokarmu lub znalezienie alternatywnego źródła pokarmu.

Dobór badanych stężeń

27. W doborze odpowiednich badanych stężeń pomocna powinna być uprzednia znajomość toksyczności badanej substancji chemicznej np. z badań ustalających zakres. W stosownych przypadkach badanie ustalające zakres stężeń przeprowadza się, stosując pięć stężeń badanej substancji chemicznej w zakresie 0,1–1 000 mg/kg suchej gleby z co najmniej jedną kontrpróbą w odniesieniu do zabiegów i próby kontrolnej. Badanie ustalające zakres trwa 14 dni i po jego zakończeniu określa się śmiertelność dorosłych osobników roztoczy oraz liczbę osobników młodych. Wyboru zakresu stężenia w badaniu końcowym najlepiej dokonać tak, aby obejmował stężenia, przy których obserwuje się wpływ na liczbę osobników młodych, natomiast niemające wpływu na przeżywalność pokolenia matki. Może to jednak być niemożliwe w odniesieniu do substancji chemicznych mających letalny lub subletalny wpływ przy niemal podobnych stężeniach. Stężenie efektywne (np. EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}) i zakres stężeń, powyżej którego skutki działania badanej substancji chemicznej stają się przedmiotem zainteresowania, należy umieścić między wartościami stężeń objętych badaniem. Ekstrapolowanie wyników znacznie poniżej najniższego stężenia, przy którym obserwuje się zmiany mające wpływ na organizmy użyte do badania, lub powyżej najwyższego badanego stężenia należy wykonać jedynie w wyjątkowych przypadkach, a w sprawozdaniu należy przedstawić pełne uzasadnienie.

Projekt doświadczenia*Badania dotyczące reakcji na dawkę*

28. Proponowane są trzy projekty badania w oparciu o zalecenia wynikające z innego badania międzylaboratoryjnego (badanie dotyczące rozmnażania wazonkowców (22)). Ogólną przydatność wszystkich tych projektów potwierdził wynik weryfikacji *H. aculeifer*.
29. Przy ustalaniu zakresu stężeń należy wziąć pod uwagę, co następuje:
- w celu wyznaczenia EC_x (np. EC_{10} , EC_{50}) należy poddać badaniom dwanaście stężeń. Zaleca się co najmniej dwie kontrpróby dla każdego badanego stężenia oraz sześć kontrprób kontrolnych. Współczynnik rozstawienia stężeń może być zróżnicowany, tj. może być równy lub mniejszy niż 1,8 w oczekiwanym przedziale skutków oraz może przekraczać 1,8 przy wyższych i niższych stężeniach;
 - w celu wyznaczenia NOEC należy zbadać co najmniej pięć stężeń uporządkowanych w szereg geometryczny. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego badanego stężenia i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 2,0-krotność poprzedniego;
 - połączone podejście umożliwia wyznaczenie zarówno NOEC, jak i EC_x . Należy zastosować osiem badanych stężeń uporządkowanych w szereg geometrycznym. Zaleca się cztery kontrpróby dla każdego zabiegu i dodatkowo osiem prób kontrolnych. Kolejne stężenie nie powinno być większe niż 1,8-krotność poprzedniego;

Badanie graniczne

30. Jeżeli w badaniu ustalającym zakres stężeń w przypadku najwyższego stężenia (tj. 1 000 mg/kg suchej masy gleby) nie zaobserwowano żadnych efektów, jako badanie graniczne można przeprowadzić badanie rozrodczości, stosując badane stężenie 1 000 mg/kg suchej masy gleby. Badanie graniczne zapewni możliwość wykazania, że NOEC lub EC_{10} w przypadku rozrodczości jest wyższe niż stężenie graniczne, przy czym do badania używa się minimalnej liczby roztoczy. Należy zastosować osiem kontrprób zarówno w odniesieniu do gleby podanej zabiegowi, jak i próby kontrolnej.

Czas trwania badania i pomiary

31. Należy zarejestrować wszelkie zaobserwowane różnice występujące między zachowaniem i morfologią roztoczy w próbie kontrolnej i w naczyniu poddanemu zabiegowi.
32. W 14. dniu żywe roztoczy wydobywa się z gleby za pomocą ekstrakcji ciepłem/światłem lub inną odpowiednią metodą (zob. dodatek 5). Młode (tj. larwy, protonimfy i poczwarki) i dorosłe osobniki liczy się oddzielnie. Dorosłe roztoczy, których nie znaleziono na tym etapie, odnotowuje się jako martwe, zakładając, że takie roztoczy padły i rozłożyły się przed oceną. Skuteczność ekstrakcji w próbach kontrolnych musi podlegać ocenie raz lub dwa razy w roku, przy czym liczba osobników dorosłych i młodych musi być znana. Średnia skuteczność wszystkich stadiów rozwojowych powinna być wyższa niż 90 % (zob. dodatek 5). Obliczenia dotyczące osobników dorosłych i młodych nie są korygowane pod kątem skuteczności.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**Opracowanie wyników**

33. Informacje na temat metod statystycznych, które można wykorzystać do analizy wyników badania, znajdują się w pkt 36–41. Ponadto należy zapoznać się z dokumentem OECD nr 54 »Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application« (31).
34. Zdolność rozrodcza, czyli liczba młodych osobników wyprodukowanych w przeliczeniu na naczynie badawcze z kontrpróbą (z 10 wprowadzonymi dorosłymi samcami), stanowi główny punkt końcowy badania. Do celów analizy statystycznej dotyczącej zdolności rozrodczej wymagane jest obliczenie średniej arytmetycznej ($\bar{X}$) oraz wariancji (s^2) w odniesieniu do zabiegu i próby kontrolnej. $\bar{X}$ i s^2 stosuje się w odniesieniu do procedur ANOVA, takich jak test t-Studenta, test Dunnetta lub test Williamsa, a także w celu obliczenia przedziałów ufności 95 %.

Uwaga: główny punkt końcowy jest równoważny z płodnością stanowiącą liczbę młodych osobników wyprodukowanych podczas badania, podzieloną przez liczbę rodzicielskich samic wprowadzonych na początku badania.

35. Liczba żywych samic w próbach kontrolnych, których nie poddano działaniu substancji, stanowi główne kryterium ważności i musi być udokumentowana. Podobnie jak w przypadku badania ustalającego zakres, wszystkie pozostałe objawy szkodliwości należy również zawrzeć w sprawozdaniu końcowym.

ECx

36. Wartości ECx, w tym powiązane z nimi górne i dolne granice ufności na poziomie 95 % w odniesieniu do parametru określonego w pkt 34, oblicza się za pomocą odpowiednich metod statystycznych (np. analizy probitowej, krzywej logistycznej, funkcji Weibulla, metody Spearmana-Kärbera lub prostej interpolacji). EC_x otrzymuje się, wstawiając wartość odpowiadającą x % średniej grupy kontrolnej do wybranego równania. Aby obliczyć EC₅₀ lub dowolną inną wartość EC_x, należy zastosować analizę regresji w odniesieniu do średnich z poszczególnych zabiegów (X).

NOEC/LOEC

37. Jeżeli analiza statystyczna ma na celu wyznaczenie NOEC/LOEC, niezbędne są dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyni (poszczególne naczynia uznaje się za kontrpróby). Należy stosować odpowiednie metody statystyczne (zgodnie z dokumentem OECD nr 54 »Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application«). Ogólnie rzecz biorąc, niekorzystne skutki podania badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną bada się, stosując test jednostronnej (mniejszej) hipotezy na poziomie $p \leq 0,05$. Przykłady znajdują się w kolejnych punktach.
38. Normalny rozkład danych można zbadać np. za pomocą testu zgodności Kołmogorowa-Smirnowa, testu stosunku zakresu do standardowego odchylenia (test R/s) lub testu Shapiro-Wilka (dwustronny, $p \leq 0,05$). W badaniu jednorodności wariancji można zastosować test Cochrańa, test Levene'a lub test Bartletta (dwustronny, $p \leq 0,05$). Jeżeli warunki metod parametrycznych badania (normalność, jednorodność wariancji) są spełnione, można wykonać jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) i kolejne testy wielokrotnego porównywania. Testy wielokrotnego porównywania (np. test t Dunnetta) lub testy regresyjne (test Williamsa w przypadku monotonicznej zależności dawka-odpowiedź) mogą być stosowane w celu obliczenia, czy istnieje znacząca różnica ($p \leq 0,05$) między próbami kontrolnymi a różnymi stężeniami badanej jednostki (wybór zalecanego testu zgodny z dokumentem OECD nr 54 »Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application«). W przeciwnym razie NOEC i LOEC należy określić za pomocą metod nieparametrycznych (np. za pomocą korekty Bonferroniego zgodnie z testem trendu Holma lub Jonckheere'a-Terpstra).

Badanie graniczne

39. Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne (porównanie próby kontrolnej z jedną tylko próbą poddaną zabiegowi) i spełniono warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur badania (normalność, jednorodność), odpowiedzi metryczne można ocenić za pomocą testu t-Studenta. Jeżeli warunki te nie zostały spełnione, można zastosować test t-Studenta (test t-Welcha) dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, taki jak test Manna-Whitneya.
40. Aby określić znaczące różnice między próbami kontrolnymi (próbą kontrolną i próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem), można wykonać badanie kontrprób każdej próby kontrolnej zgodnie z opisem dotyczącym badania granicznego. Jeżeli w wyniku tych badań nie zostaną wykryte znaczące różnice, wszystkie próby kontrolne i kontrpróby kontrolne z rozpuszczalnikiem mogą być połączone. W przeciwnym wypadku wszystkie zabiegi należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem.

Sprawozdanie z badania

41. Sprawozdanie z badania powinno zawierać co najmniej następujące informacje:

— *Badana substancja chemiczna*

- nazwa badanej substancji chemicznej, nazwa systematyczna, partia, seria i numer CAS, stopień czystości;
- właściwości fizykochemiczne badanej substancji (np. log K_{ow}, rozpuszczalność w wodzie, prężność pary, stała Henry'ego (H) i najlepiej informacje o losach badanej substancji chemicznej w glebie).

— *Organizmy użyte do badania*

- identyfikacja gatunku i dostawców organizmów użytych do badania, opis warunków hodowli;
- przedział wiekowy organizmów użytych do badania.

— Warunki badania

- opis projektu doświadczenia i procedury;
- szczegóły przygotowania gleby do badania; szczegółową specyfikację, jeżeli używa się naturalnej gleby (pochodzenie, historia, rozkład wielkości cząstek, pH, zawartość związków organicznych oraz klasyfikacja gleby, jeżeli jest dostępna);
- maksymalna pojemność wodna gleby;
- opis techniki stosowanej do wprowadzenia badanej substancji chemicznej do gleby;
- szczegółowe dane dotyczące pomocniczych substancji chemicznych użytych w celu podania badanej substancji chemicznej;
- rozmiar naczyń badawczych i sucha masa badanej gleby na naczynie;
- natężenie światła, czas trwania cykli światło–brak światła, temperatura;
- opis schematu żywienia, rodzaj i ilość pokarmu używanego w badaniu, terminy karmienia;
- pH i zawartość wody w glebie na początku i w trakcie badania (próba kontrolna i każda próba poddana zabiegowi);
- szczegółowy opis metody ekstrakcji i skuteczności ekstrakcji.

— Wyniki badania:

- liczba osobników młodych oznaczonych w naczyniu badawczym na końcu badania;
- liczba dorosłych samic i śmiertelność dorosłych osobników (%) w każdym naczyniu badawczym na końcu badania;
- opis wyraźnych symptomów fizjologicznych lub widocznych zmian w zachowaniu;
- wyniki otrzymane z wykorzystaniem badanej substancji chemicznej odniesienia;
- statystyki podsumowujące (EC_x lub NOEC) w tym granice ufności na poziomie 95 % oraz opis metody obliczania;
- wykres zależności stężenie–odpowiedź;
- odchylenia od procedur opisanych w niniejszej metodzie badawczej oraz wszelkie nietypowe zdarzenia, jakie miały miejsce podczas badania.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21–46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259–274.
- (3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. i 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. Wydanie 2. W: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, s. 523.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). W: F. Dusbabek i V. Bukva (red.): *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, Haga, tom 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*: s. 241–249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: s. 621–628.
- (8) Krogh, P.H. i Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. W: Lokke, H. i van Gestel, C.A.M.: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley Sons, Chichester, s. 239–251.

- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. i Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. W: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. i Tarazona, J.V. (red.). SETAC Press, Pensacola, Stany Zjednoczone. 128 s.
- (10) Schlosser, H.-J. i 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. i 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. i 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 (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Determination of pH, nr 10390. ISO, Genewa.
- (15) Rozdział C.8 niniejszego załącznika, Toksyczność dla dżdżownic.
- (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 (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1993). Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, nr 11465. ISO, Genewa.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. i Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, Stany Zjednoczone.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimbriatus* Gisin (Collembola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J., i Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395–433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. i 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) Rozdział C.32 niniejszego załącznika – Badanie rozrodczości wazonkowcowatych.
- (23) ISO (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, nr 11268-2 ISO, Genewa. ISO, Genewa.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (wydanie 2.). Chapman & Hall, Londyn, s. 524.
- (25) Dunger, W. i Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (wydanie 2.). G. Fischer, Jena, s. 539.
- (26) Lesna, I. i 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. i 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 54. ENV/JM/MONO(2006)18.
-

*Dodatek 1***Definicje**

Do niniejszej metody badawczej mają zastosowanie następujące definicje (w tym badaniu wszystkie stężenia powodujące zmiany wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby):

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym nie obserwuje się żadnych szkodliwych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego skutku ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia, jeżeli porówna się je z próbą kontrolną.

LOEC (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany) oznacza najniższe stężenie badanej substancji chemicznej mające statystycznie istotny skutek ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną.

EC_x (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływu na organizmy użyte do badania w danym okresie narażenia, w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC₅₀ jest stężeniem, które w przybliżeniu ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Określenie maksymalnej pojemności wodnej gleby

Jak wykazano, do określania maksymalnej pojemności wodnej gleby (WHC) odpowiednia jest poniższa metoda. Została ona opisana w załączniku C do normy ISO DIS 11268-2 (Jakość gleby – wpływ zanieczyszczeń na dżdżownice (*Eisenia fetida*)). Część 2: Oznaczanie wpływu na rozmnażanie (23)).

Pobrać do badania określoną ilość (np. 5 g) gleby z podłoża za pomocą odpowiedniego przyrządu (wybieraka ślimakowego itp.). Przykryć dno wybieraka mokrym kawałkiem bibuły filtracyjnej, a następnie umieścić wybierak na stelażu w łaźni wodnej. Wybierak należy stopniowo zanurzać aż do momentu, gdy poziom wody znajdzie się powyżej powierzchni gleby. Następnie należy zostawić go w wodzie na około trzy godziny. Ponieważ nie cała woda wchłonięta przez kapilary w glebie może zostać zatrzymana, należy umieścić wybierak na podłożu z wilgotnego drobno zmielonego piasku kwarcowego umieszczonego w przykrytym naczyniu (aby zapobiec wysychaniu) na dwie godziny w celu odsączenia próbki gleby. Próbkę należy następnie zważyć, wysuszyć do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C. Pojemność wodną gleby (WHC) można następnie obliczyć w następujący sposób:

$$\text{WHC (w \% suchej masy)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdzie:

S = podłoże nasycone wodą + masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej

T = tara (masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej)

D = sucha masa podłoża

*Dodatek 3***Określenie pH gleby**

Podana poniżej metoda określania pH gleby opiera się na opisie zawartym w normie ISO DIS 10390: Jakość gleby – Oznaczanie pH (16).

Określoną ilość gleby suszy się w temperaturze pokojowej przez co najmniej 12 godzin. Następnie sporządzana jest zawiesina gleby (zawierająca co najmniej 5 gramów gleby) w 1-molowym roztworze chlorku potasu czystego do analizy (KCl) lub 0,01-molowym roztworze chlorku wapnia czystego do analizy (CaCl_2) o objętości pięciokrotnie większej od objętości gleby. Otrzymaną zawiesinę dokładnie wymieszać, wstrząsając przez pięć minut, a następnie odstawić do osadzenia się na co najmniej 2 godziny, ale nie na dłużej niż 24 godziny. W fazie ciekłej pH jest mierzone za pomocą pehametru, który jest kalibrowany przed każdym pomiarem przy użyciu odpowiedniego szeregu roztworów buforowych (np. pH 4,0 i 7,0).

Dodatek 4

Hodowla *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, roztoczy spożywczych oraz synchronizacja hodowli**Hodowla *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:**

Hodowle mogą być prowadzone w naczyniach z tworzywa sztucznego lub w szklanych słojach wypełnionych gipsem modelarskim / mieszaniną proszku węglowego (9:1). Gips można zwilżać, dodając, w razie potrzeby, kilka kropel wody destylowanej lub dejonizowanej. Optymalne temperatury do hodowli wahają się między 20 ± 2 °C, a cykl światło/bez dostępu światła nie jest istotny dla tego gatunku. Pożywienie mogą stanowić roztocza *Tyrophagus putrescentiae* lub *Caloglyphus* sp. (z roztoczami spożywczymi należy postępować ostrożnie, ponieważ mogą powodować alergie u ludzi), ale nicienie, wazonkowce i skoczogonki również są odpowiednimi jednostkami pożywienia. Należy odnotowywać ich źródło. Rozwój populacji może rozpocząć się od jednej samicy, ponieważ samce rozwijają się w niezapłodnionych komórkach jajowych. Pokolenia w dużej mierze nakładają się na siebie. Samice mogą żyć co najmniej 100 dni i w tym czasie mogą złożyć około 100 jaj. Maksymalna liczba jaj składana jest między 10. a 40. dniem (po osiągnięciu dojrzałości) i wynosi $2,2$ jaja na samicę⁻¹ na dzień⁻¹. Okres rozwoju od komórki jajowej do dorosłej samicy w temperaturze 20 °C wynosi około 20 dni. Należy z wyprzedzeniem prowadzić i utrzymywać więcej hodowli niż jedna.

Hodowla *Tyrophagus putrescentiae*:

Roztocza hoduje się w szklanym naczyniu wypełnionym drobnym proszkiem z drożdży browarnianych, które umieszcza się w pojemniku z tworzywa sztucznego wypełnionym roztworem KNO₃, aby nie dopuścić do ucieczki roztoczy. Roztocza spożywcze umieszcza się na powierzchni proszku. Następnie ostrożnie miesza się je z proszkiem (który należy wymieniać dwa razy w tygodniu) za pomocą szpatułki.

Synchronizacja hodowli:

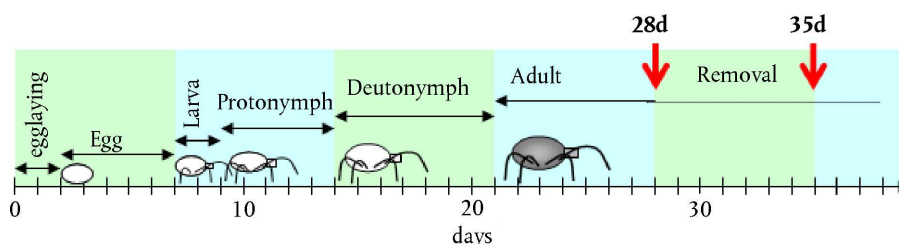
Próbki użyte w badaniu powinny być w podobnym wieku (około 7 dni po osiągnięciu dorosłego stadium). W temperaturze hodowli wynoszącej 20 °C jest to możliwe dzięki

przeniesieniu samic do czystych naczyń hodowlanych i podaniu odpowiedniej ilości pokarmu:

- umożliwić składanie jaj przez dwa do trzech dni, usunąć samice;
- poddać samice badaniu między 28. a 35. dniem po umieszczeniu dorosłych samic w czystych naczyniach hodowlanych.

Dorosłe samice można z łatwością odróżnić od samców i osobników w innych stadiach rozwoju dzięki większemu rozmiarowi, nabrzmiałemu kształtowi i brązowej tarczy grzbietowej (samce są mniejsze i płaskie), osobniki niedojrzałe są w barwie od białej do kremowej. Rozwój roztoczy w temperaturze 20 °C jest w przybliżeniu zgodny ze schematem opisanym poniżej (rysunek): komórka jajowa – 5d, larwa – 2d, protonimfa – 5d, poczwarka – 7d, okres przed składaniem jaj przez samicę – 2d. Następnie roztocza osiąga dojrzałość.

Rysunek

Rozwój *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* w temperaturze 20 °C (usuwanie = samice użyte do badania)

Dorosłe zwierzęta użyte do badań usuwa się z zsynchronizowanej hodowli i wprowadza do naczynia badawczego między 28. a 35. dniem po rozpoczęciu składania jaj przez rodzicielskie samice (tj. 7–14 dni po osiągnięciu przez nie dojrzałości). Stanowi to gwarancję, że zwierzęta użyte do badań przeszły przez okres poprzedzający składanie jaj i zostały skojarzone z samcami, które również są obecne w naczyniu do hodowli. Obserwacje hodowli laboratoryjnych wskazują, że w przypadku obecności samców samice rozpoczynają rozmnażanie niezwłocznie lub wkrótce po osiągnięciu dojrzałości (Ruf, Vaninnen, obserwacje własne). Okres siedmiu dni wybiera się, aby ułatwić integrację w procedurze laboratoryjnej oraz aby zmniejszyć indywidualne różnice w rozwoju występujące między roztocami. Proces składania jaj należy rozpocząć z co najmniej taką samą liczbą samic, jaka jest ostatecznie niezbędna do wykonania badania (jeżeli np. 400 samic potrzeba do wykonania badania, co najmniej 400 samicom należy umożliwić składanie jaj przez 2–3 dni). Co najmniej 1 200 jaj powinno stanowić punkt wyjścia dla zsynchronizowanej populacji (proporcja płci około 0,5, śmiertelność około 0,2). Aby uniknąć kanibalizmu, odpowiednie byłoby przechowywanie w jednym naczyniu nie więcej niż 20–30 samic składających jaja.

Dodatek 5

Metody ekstrakcji

W przypadku mikro-stawonogów odpowiednią metodą na oddzielenie próbek od gleby/podłoża jest ekstrakcja ciepłem (zob. rysunek poniżej). Metoda ta opiera się na aktywności organizmów, więc odnotowane zostaną jedynie ruchome okazy. Zasadą ekstrakcji ciepłem jest zapewnienie organizmom stopniowo pogarszających się warunków w próbce, tak aby opuściły podłoże i wpadły w utrwalającą ciecz (np. etanol). Kluczowy punkt stanowi czas trwania ekstrakcji i gradient zmiany warunków dla organizmów z dobrych na średnie i złe. Czas trwania ekstrakcji w odniesieniu do badań ekotoksykologicznych musi być jak najkrótszy, ponieważ wszelki wzrost populacji podczas ekstrakcji zafałszowałby wyniki. Z drugiej strony temperatura i wilgoć w próbce zawsze muszą utrzymywać się na poziomie umożliwiającym roztoczom poruszanie się. Ogrzanie próbki gleby prowadzi do wyschnięcia podłoża. Jeżeli wysychanie następuje zbyt szybko, część roztoczy również może wyschnąć zanim zdąży uciec.

W związku z tym proponowana jest następująca procedura (24) (25):

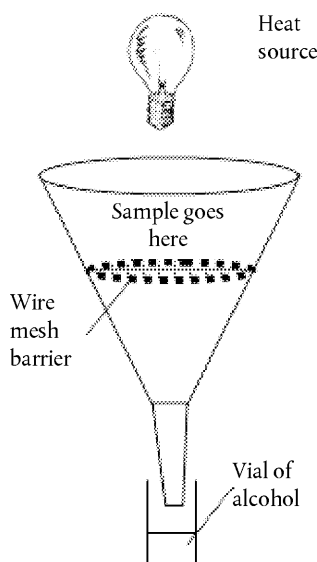
Aparatura: lejek Tullgrena lub podobne metody, np. metoda McFadyena (ogrzewając z góry, próbę umieszcza się na lejku).

System ogrzewania: 25 °C przez 12 godzin, 35 °C przez 12 godzin, 45 °C przez 24 godziny (w sumie 48 godzin). Należy mierzyć temperaturę podłoża.

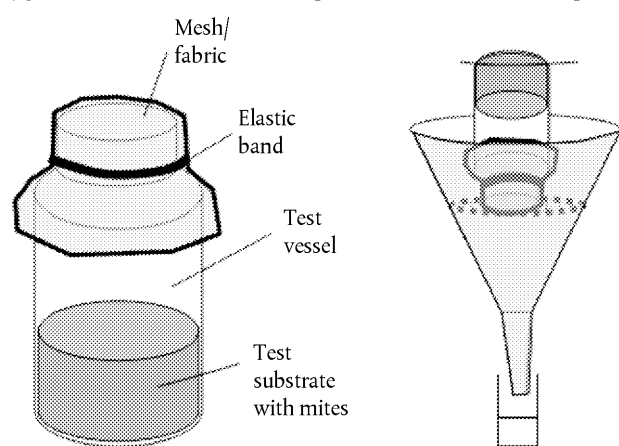
Ciecz utrwalająca: 70-procentowy etanol.

Szczegóły: Wziąć szklaną fiolkę użytą do badania. Zdjąć pokrywkę i owinąć otwór siatką lub tkaniną. Tkanina powinna mieć oczka wielkości 1,0–1,5 mm. Przymocować tkaninę elastyczną gumką. Ostrożnie odwrócić fiolkę do góry nogami i umieścić ją w aparaturze służącej do ekstrakcji. Tkanina chroni podłoże przed przedostaniem się do cieczy utrwalającej, ale umożliwia roztoczom opuszczenie próbki. Po umieszczeniu w aparaturze wszystkich fiolek rozpocząć ogrzewanie. Zakończyć proces ekstrakcji po upływie 48 godzin. Usunąć utrwalone fiolki i policzyć roztocza za pomocą mikroskopu preparacyjnego.

Skuteczności ekstrakcji w ramach wybranej metody należy dowodzić raz lub dwa razy w roku, stosując naczynia zawierające określoną liczbę młodych i dorosłych roztoczy przetrzymywanych w podłożu użytym w badaniu, niepoddanym działaniu substancji chemicznej. Średnia skuteczność wszystkich stadiów rozwojowych powinna wynosić $\geq 90\%$.

Przyrząd do ekstrakcji (wersja aparatu Tullgrena)

Sposób przygotowania fiolki do badania po zakończeniu badania, przed ekstrakcją



Dodatek 6

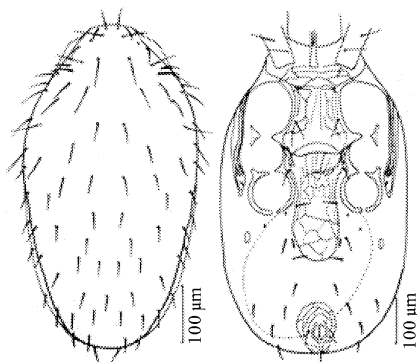
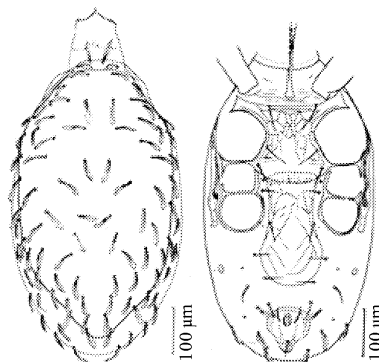
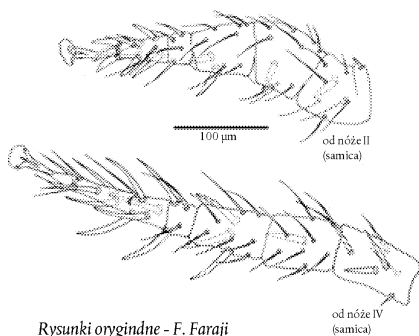
Identyfikacja *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Podgromada/rząd/podrząd:	Rodzina:	Rodzaj/podrodzaj/gatunek:
Roztocza/dręcze/żukowce	Laelapidae	<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>

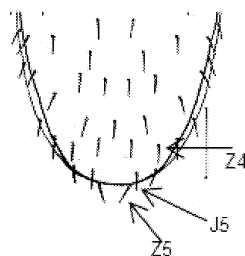
Autor i data:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 stycznia 2007 r.

Zastosowana bibliografia:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, wersja druga zmieniona: 1–523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministerstwo Rolnictwa, Rybołówstwa i Żywności, biuletyn techniczny 9: 400 s. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., s. 509

Cechy deterministyczne:	Okrywa o okrągłej, ząbkowanej krawędzi; hypostomowe rowki z co najmniej sześcioma ząbkami; niezbyt długie ogonowe i grzbietowe włoski Z4; zwykła tarcza płciowa, nieznacznie rozbudowana i niesięgająca tarczy odbytowej; tylna część tarczy grzbietowej ze sparowanym włosiem; odnóża II i IV z gęstym włosiem; włosie grzbietowe Z5 około dwóch razy dłuższe niż J5; stała liczba szczękoczułków z 12–14 zębami i zmienna liczba szczękoczułków z dwoma zębami; długość idiosomy 520–685 µm. <i>Hypoaspis miles</i> używa się również w biologicznych próbach kontrolnych i łatwo je pomylić z <i>H. aculeifer</i>. Główne różnice to: <i>H. miles</i> należą do podrodzaju <i>Cosmolaelaps</i> i posiadają włoski grzbietowe w kształcie noża, natomiast <i>H. aculeifer</i> należą do podrodzaju <i>Geolaelaps</i> i posiadają włoski grzbietowe przypominające sierść.

*Hypoaspis aculeifer* wg Hughes, 1976*Hypoaspis miles* wg Hughes, 1976

Rysunki oryginalne - F. Faraji

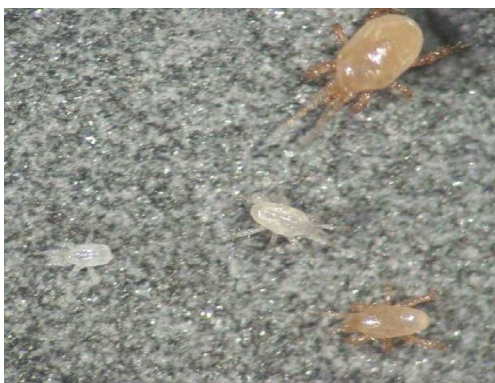
*Hypoaspis aculeifer*, tarcza grzbietowa z charakterystycznymi włoskami

Dodatek 7

Podstawowe informacje dotyczące biologii *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer należy do rodziny *Lealapidae*, rzędu *Acari* (roztoczy), gromady pajęczaków, typu stawonogów. Żyje we wszystkich rodzajach gleb i żywi się innymi roztoczymi, nicieniami, wazonkowcami i skoczogonkami (26). W przypadku braku pokarmu przechodzi na kanibalizm (27). Drapieżne roztocza składają się z segmentów, takich jak idiosoma i gnatosoma. Nie istnieje wyraźny podział idiosomy na głowotułów i odwłok. Gnatosoma (pancerz głowy) obejmuje narządy gębowe, takie jak nogogłaszczki i szczękoczułki. Szczękoczułki składają się z trzech segmentów i służą do walki, wyposażone są w zęby o różnym kształcie. Poza połykaniem samce używają szczękoczułek głównie do przekazywania spermatoforów samicy. Tarcza grzbietowa niemal w całości pokrywa idiosomę. Dużą część idiosomy samicy zajmują organy rozrodcze, które są szczególnie wyraźne na krótko przed złożeniem jaj. W powierzchni brzusznej można wyróżnić tarczę mostkową i tarczę płciową. Wszystkie pary odnóży wyposażone są we włosie i kolce. Włosie służy do ustabilizowania pozycji podczas poruszania się w glebie lub na jej powierzchni. Pierwsza para odnóży używana jest głównie jako antena. Druga para odnóży służy nie tylko do poruszania się, ale również do zaciśnięcia na ofierze. Kolce znajdujące się na czwartej parze odnóży mogą służyć jako ochrona, a także jako »siła napędowa« (28). Długość samców wynosi 0,55–0,65 mm, a ich waga 10–15 µg. Długość samic wynosi 0,8–0,9 mm, a ich waga 50–60 µg (8) (28) (rys. 1).

Rys. 1

Samica, samiec, protonimfa i larwa *H. aculeifer*.

W temperaturze 23 °C roztocza osiągają dojrzałość płciową odpowiednio po upływie 16 dni (samice) i 18 dni (samce) (6). Samice przenoszą plemniki za pomocą solenostom, skąd następnie zostają one przeniesione do pokładełka. W pokładełku plemniki są przechowywane i dojrzewają. Do zapłodnienia dochodzi dopiero, gdy plemniki w pokładełku osiągną dojrzałość. Zapłodnione lub niezapłodnione jaja będą składane przez samice w skupiskach lub oddzielnie, najlepiej w szczelinach lub otworach. Kopulujące samice mogą wydać osobniki młode obu płci, natomiast z jaj niekopulujących samic wylęgną się jedynie młode osobniki męskie. Podczas procesu osiągnięcia dojrzałości osobnik przechodzi cztery fazy rozwoju (jajo–larwa, larwa–protonimfa, protonimfa–poczwarka, poczwarka–osobnik dorosły).

Jajo ma barwę mleczno-białą, jest szkliste, ma eliptyczny kształt i około 0,37 mm długości oraz solidną skorupę. Zgodnie z pozycją bibliograficzną (8) larwy osiągają rozmiar 0,42–0,45 mm. Mają tylko trzy pary odnóży. W okolicy głowy posiadają rozwinięte nogogłaszczki i szczękoczułki. Szczękoczułki wyposażone w kilka małych ząbków służą do wyklucia się z jaja. Po pierwszej wylince, 1–2 dni po wylęgu, rozwijają się protonimfy. Są również białe, osiągają rozmiar 0,45–0,62 mm (8) i mają cztery pary odnóży. Na całej powierzchni szczękoczułek obecne są zęby. Począwszy od tego stadium, roztocza zaczynają szukać pożywienia. Z tego powodu powłoka ofiary jest przebijana szczękoczułkami i produkt dodatkowego trawienia jelitowego jest wydzielany do ofiary. Roztocza mogą więc wessać rozdrobniony pokarm. Szczękoczułki mogą również służyć do rozdrabniania większych części pokarmu (28). Po kolejnej wylince rozwijają się poczwarki. Osiągają rozmiar od 0,60 do 0,80 mm (8) i mają barwę od żółtej do jasnobrązowej. Począwszy od tego etapu można je podzielić na samice i samce. Po kolejnej wylince, podczas której zwierzęta są nieaktywne i wykształca się brązowa tarcza (po ok. 14 dniach), roztocza stają się osobnikami dorosłymi (28) (29) (30). Ich cykl życia wynosi około 48–100 dni w temperaturze 25 °C (27).

Dodatek 8

**Podsumowanie i harmonogram głównych działań, jakie należy podjąć, aby wykonać badanie
Hypoaspis**

Czas (dni) rozpoczęcia badania = dzień 0	Działanie/zadanie
Dzień – 35 – 28.	Przenieść samice z kultury wyjściowej, aby wyczyścić naczynie w celu rozpoczęcia synchronizacji 2 dni później: usunąć wszystkie samice Dwa lub trzy razy w tygodniu: dostarczać odpowiedni pokarm
Dzień – 5 (+/- 2)	Przygotować sztuczną glebę
Dzień – 4 (+/- 2)	Określić pojemność wodną sztucznej gleby (WHC) Suszyć przez noc Następnego dnia: zważyć próbki i obliczyć WHC
Dzień – 4 (+/- 2)	Nawilżyć wstępnie sztuczną glebę do osiągnięcia 20–30 % WHC
Dzień 0	Rozpoczęcie badania: dodać badaną substancję chemiczną do sztucznej gleby Wprowadzić 10 samic do każdej kontrpróby Zważyć każdą kontrpróbę Przygotować abiotyczne próby kontrolne w odniesieniu do zawartości wilgoci i pH, 2 kontrpróby do każdego zabiegu Suszyć próby kontrolne z wilgocią przez noc Następnego dnia: zważyć próby kontrolne z wilgocią Następnego dnia: zmierzyć pH suchych abiotycznych prób kontrolnych
Dzień 3, 6, 9, 12 (w przybliżeniu)	Dostarczyć każdej kontrpróbie wystarczającą ilość organizmów służących za pokarm Zważyć każdą kontrpróbę i ostatecznie uzupełnić odparowaną wodę
Dzień 14	Zakończyć badanie, rozpocząć ekstrakcję we wszystkich kontrpróbach oraz kontrolę skuteczności ekstrakcji Suszyć przez noc próby kontrolne z zawartością wody Następnego dnia: zważyć próby kontrolne z zawartością wody Następnego dnia: zmierzyć pH suchych prób kontrolnych
Dzień 16	Zakończyć ekstrakcję
Dzień 16 +	Odnotować liczbę osobników dorosłych i młodych w wydobytym materiale Opisać wyniki we wzorcowych tabelach Opisać procedurę badawczą w arkuszu protokołu dotyczącego badania

C.37. 21-DNIOWE BADANIE RYB: KRÓTKOTERMINOWE BADANIE PRZESIEWOWE AKTYWNOŚCI ESTROGENNEJ I ANDROGENNEJ ORAZ ZAHAMOWANIE AROMATAZY**WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 230 (2009). Konieczność opracowania i zweryfikowania badania ryb umożliwiającego wykrycie określonych substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego wynika z obawy, że środowiskowe poziomy substancji chemicznych mogą wywoływać działania niepożądane zarówno u ludzi, jak i w przypadku dzikiej flory i fauny ze względu na interakcję tych substancji chemicznych z układem hormonalnym. W 1998 r. OECD zapoczątkowała działania o najwyższym priorytecie mające na celu przegląd istniejących wytycznych dotyczących badań i opracowanie nowych wytycznych dotyczących odsiewania i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Jednym z elementów tych działań było opracowanie wytycznej dotyczącej badań w odniesieniu do odsiewania substancji chemicznych oddziałujących na układ hormonalny określonych gatunków ryb. 21-dniowe badanie przesiewowe układu hormonalnego ryb poddano zakrojonemu na szeroką skalę programowi weryfikacji, który obejmował badania międzylaboratoryjne z wykorzystaniem wybranych substancji chemicznych, aby wykazać, że badanie przesiewowe stanowi istotną i wiarygodną metodę wykrywania substancji chemicznych hamujących aktywność estrogenną i aromatazę (1, 2, 3, 4, 5) u trzech badanych gatunków ryb (*Pimephales promelas*, ryżanki japońskiej i danio przegowanego); wykrycie działania androgennego jest możliwe u *Pimephales promelas* i ryżanki, lecz nie w przypadku danio przegowanego. Niniejsza metoda badawcza nie pozwala jednak na wykrycie substancji chemicznych o działaniu antyandrogennym. Działania weryfikacyjne zostały zrecenzowane przez panel ekspertów powołanych przez koordynatorów krajowych programu wytycznych dotyczących badań (6). Przedmiotowe badanie nie ma na celu zidentyfikowania konkretnych mechanizmów zaburzeń hormonalnych, ponieważ zwierzęta użyte do badania mają nieuszkodzoną oś podwzgórze-przysadka-gonady, która może reagować na substancje chemiczne wywierające wpływ na oś podwzgórze-przysadka-gonady na różnych poziomach. Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb (dotycząca badań wytyczna OECD nr 229) obejmuje płodność i, w razie potrzeby, histopatologię gonad w przypadku *Pimephales promelas*, jak również wszystkie punkty końcowe uwzględnione w niniejszej metodzie badawczej. W dotyczącej badań wytycznej OECD nr 229 przewidziano badanie przesiewowe substancji chemicznych, które mają wpływ na rozrodczość, za pomocą różnych mechanizmów, w tym zmian hormonalnych. Należy to rozważyć przed wyborem najodpowiedniejszej metody badawczej.
2. W niniejszej metodzie badawczej opisuje się badanie przesiewowe *in vivo*, w którym dojrzałe płciowo samce ryb i samice ryb w okresie tarła przetrzymuje się razem i poddaje działaniu substancji chemicznej przez ograniczoną część ich cyklu życia (21 dni). Na zakończenie 21-dniowego okresu narażenia, w zależności od wykorzystanego gatunku, mierzy się jeden lub dwa punkty końcowe dotyczące biomarkerów dla samców i samic jako wskaźniki działania estrogennego, zahamowania aromatazy lub działania androgennego badanej substancji chemicznej; te punkty końcowe to witellogenina i drugorzędne cechy płciowe. Witellogeninę mierzy się u *Pimephales promelas*, ryżanki japońskiej i danio przegowanego, zaś drugorzędne cechy płciowe mierzy się tylko u *Pimephales promelas* i ryżanki japońskiej.
3. Ten test biologiczny służy jako badanie przesiewowe *in vivo* dla określonych trybów działania hormonalnego, a jego zastosowanie należy rozpatrywać w kontekście dokumentu zatytułowanego «OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals» (28).

UWAGI WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. Witellogenina jest normalnie wytwarzana w wątrobie jajorodnych kręgowców płci żeńskiej w reakcji na endogenne estrogeny w układzie krążenia. Jest ona prekursorem białek żółtka i po wytworzeniu w wątrobie jest przenoszona przez krew do jajnika, gdzie jest pobierana i modyfikowana przez rozwijające się komórki jajowe. Witellogenina jest niemalże niewykrywalna w osoczu niedojrzałych samic i samców ryb, ponieważ nie mają one wystarczającej ilości estrogenu w krwiobiegu; wątroba ma jednak zdolność syntezy i wydzielania witellogeniny w reakcji na egzogenną stymulację estrogenem.
5. Pomiar witellogeniny służy wykrywaniu substancji chemicznych o różnych estrogennych charakterach działania. Wykrycie estrogennych substancji chemicznych jest możliwe dzięki pomiarowi indukcji witellogeniny u samców ryb i zostało bogato udokumentowane w recenzowanej literaturze naukowej (np. (7)). Indukcję witellogeniny wykazano również po narażeniu na działanie aromatyzowalnych androgenów (8, 9). Obniżenie poziomu estrogenu w układzie krążenia w przypadku samic, na przykład na skutek zahamowania aromatazy przekształcającej endogenne androgeny w naturalny estrogen 17 β -estradiol, powoduje zmniejszenie poziomu witellogeniny, co wykorzystuje się do wykrywania substancji chemicznych działających jak inhibitory aromatazy (10, 11). Biologiczne znaczenie reakcji witellogeniny po zahamowaniu aktywności substancji estrogennej/aromatazy zostało ustalone i szeroko udokumentowane. Możliwe jest jednak, że na wytwarzanie VTG u samic mogą również wpływać ogólna toksyczność i niehormonalne charakterystyki działania toksycznego, np. hepatotoksyczność.

6. Opracowano i znormalizowano z dobrym wynikiem kilka metod pomiaru w celu rutynowego wykorzystywania. Dotyczy to metod opartych na właściwym dla danego gatunku teście immunoenzymatycznym (ELISA), w którym wykorzystuje się immunochemię do oznaczenia ilościowego wytworzonej witellogeniny w małych próbkach krwi lub wątroby pobranych od pojedynczych osobników ryb (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). W celu dokonania pomiaru VTG pobiera się próbki krwi *Pimephales promelas*, krwi lub homogenatu głowy/ogona danio przegowanego i wątroby ryżanki japońskiej. W przypadku ryżanki istnieje dobra korelacja między VTG mierzoną w próbkach krwi i wątroby (19). W dodatku 6 przedstawia się zalecane procedury pobierania próbek do celów analizy witellogeniny. Zestawy do pomiaru witellogeniny są powszechnie dostępne; powinny one opierać się na zweryfikowanej, właściwej dla danego gatunku metodzie ELISA.
7. Drugorzędne cechy płciowe samców niektórych gatunków ryb są widoczne na zewnątrz, są kwantyfikowalne oraz reagują na poziom endogennych androgenów w krwiobiegu; dotyczy to *Pimephales promelas* i ryżanki, lecz nie danio przegowanego, który nie posiada kwantyfikowalnych drugorzędnych cech płciowych. Samice zachowują zdolność do wykształcania drugorzędnych męskich cech płciowych, gdy zostaną narażone na działanie androgennych substancji chemicznych w wodzie. W literaturze przedmiotu można znaleźć kilka badań, które dokumentują tego rodzaju reakcję u *Pimephales promelas* (20) i ryżanki (21). Zmniejszenie nasilenia drugorzędnych cech płciowych u samców należy interpretować ostrożnie, ze względu na niską wartość mocy statystycznej, oraz opierać się na specjalistycznej opinii i wadze dowodów. Istnieją ograniczenia w zakresie wykorzystania danio przegowanego w tym badaniu ze względu na brak kwantyfikowalnych drugorzędnych cech płciowych, które reagują na substancje chemiczne o działaniu androgenym.
8. W przypadku *Pimephales promelas* głównym wskaźnikiem egzogenego narażenia na działanie androgenne jest liczba guzków godowych na pysku samic ryb. W przypadku ryżanki liczba procesów tworzenia się brodawek stanowi główny marker egzogenego narażenia samic ryb na substancje chemiczne o działaniu androgenym. W dodatkach 5A i 5B wskazano zalecane procedury, które należy stosować do oceny cech płciowych odpowiednio u *Pimephales promelas* i ryżanki.
9. Definicje stosowane w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

10. W trakcie badania samce i samice ryb w stanie reprodukcyjnym poddaje się wspólnie narażeniu w naczyniach badawczych. Ich status osobników dorosłych oraz ich stan reprodukcyjny pozwalają na wyraźne rozróżnienie płci, a w związku z tym zapewniają możliwość przeprowadzenia związanej z płcią analizy każdego parametru docelowego, jak również wrażliwość na egzogenne substancje chemiczne. Po zakończeniu badania płeć potwierdza się w badaniu makroskopowym gonad po otwarciu brzucha wzdłuż linii środkowej za pomocą nożyczek. Przegląd odpowiednich warunków testu biologicznego przedstawiono w dodatku 2. Badanie zwykle rozpoczyna się od pobrania próbki ryb z populacji w okresie tarła; nie należy wykorzystywać starzejących się zwierząt. Wytyczne dotyczące wieku ryb i stanu reprodukcyjnego podano w części dotyczącej wyboru ryb. Badanie przeprowadza się z zastosowaniem trzech stężeń ekspozycyjnych, jak również próby kontrolnej z wodą oraz, w razie potrzeby, próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem. Stosuje się dwa naczynia lub kontrpróby na zabieg (każde naczynie zawiera 5 samców i 5 samic) w przypadku ryżanki i danio przegowanego, zaś w przypadku *Pimephales promelas* stosuje się cztery naczynia lub kontrpróby na zabieg (przy czym każde naczynie zawiera 2 samce i 4 samice). Służy to uwzględnieniu zachowania terytorialnego samców *Pimephales promelas*, przy równoczesnym utrzymaniu wystarczającej mocy testu. Narażenie trwa 21 dni, a pobranie próbek ryb odbywa się w 21. dniu narażenia.
11. Przy pobraniu próbek w 21. dniu wszystkie zwierzęta uśmierca się w sposób humanitarny. Drugorzędne cechy płciowe mierzy się u *Pimephales promelas* i ryżanki (zob. dodatki 5A i 5B); próbki krwi pobiera się w celu oznaczenia witellogeniny u danio przegowanego i *Pimephales promelas*, ewentualnie można pobrać głowę/ogon w celu oznaczenia witellogeniny u danio przegowanego (dodatek 6); w celu analizy VTG u ryżanki pobiera się wątrobę (dodatek 6).

KRYTERIA AKCEPTACJI BADANIA

12. Aby wyniki badania były akceptowalne, muszą zostać spełnione następujące warunki:
 - śmiertelność w próbach kontrolnych z wodą (lub rozpuszczalnikiem) nie powinna przekraczać 10 % na koniec okresu narażenia;
 - stężenie tlenu rozpuszczonego powinno wynosić co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem (ASV) w trakcie okresu narażenia;

- różnica temperatury wody między naczyniami badawczymi przez cały okres narażenia nie może być większa niż $\pm 1,5$ °C i musi być utrzymywana w granicach 2 °C zakresu temperatur określonego w odniesieniu do badanego gatunku (dodatek 2);
- powinny być dostępne dowody pozwalające wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze utrzymano w granicach ± 20 % średnich wartości pomiarowych.

OPIS METODY

Aparatura

13. Zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

- a) mierniki tlenu i pehametry;
- b) sprzęt do oznaczania twardości i zasadowości wody;
- c) odpowiednia aparatura do pomiaru temperatury, zalecane jest stałe monitorowanie;
- d) zbiorniki wykonane z chemicznie obojętnego materiału o odpowiedniej objętości w zależności od zalecanego obciążenia i obsady (zob. dodatek 2);
- e) podłoże tarłowe dla *Pimephales promelas* i danio przegowanego, niezbędne informacje podano w dodatku 4;
- f) waga o odpowiedniej dokładności (tj. dokładności do $\pm 0,5$ mg).

Woda

14. Każda woda, w której badane gatunki wykazują odpowiednie długoterminowe przeżycie i wzrost, może być stosowana jako woda do badań. Powinna mieć stałą jakość w okresie trwania badania. Wartość pH wody powinna mieścić się w zakresie 6,5–8,5, lecz w trakcie danego badania powinna wynosić $\pm 0,5$ jednostki pH. Aby upewnić się, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbyt mocno na wyniki badania (np. przez kompleksowanie badanej substancji chemicznej), należy okresowo pobierać próbki wody do analizy. W przypadku gdy wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy mierzyć, np. co trzy miesiące, zawartość metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , i SO_4^{2-}), pestycydów (np. całkowitą zawartość pestycydów fosforoorganicznych i chloroorganicznych), całkowitą zawartość węgla organicznego i zawiesinę ogólną. Jeśli można wykazać, że jakość wody była stała przez co najmniej rok, oznaczeń można dokonywać rzadziej i w większych odstępach czasu (np. co sześć miesięcy). Niektóre właściwości chemiczne rozpuszczalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 3.

Roztwory do badań

15. Roztwory do badań o wybranych stężeniach przygotowuje się przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zalecane jest przygotowanie roztworu podstawowego przez zwykłe wymieszanie lub zbełtanie badanej substancji chemicznej w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. za pomocą mieszadła lub ultradźwięków). Kolumny nasyceniowe (rozpuszczające) stosuje się w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Nie zaleca się stosowania nośnika rozpuszczalnikowego. W przypadku gdy rozpuszczalnik jest niezbędny, należy równolegle przeprowadzić próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem w tym samym stężeniu rozpuszczalnika, które zastosowano w grupie poddanej zabiegom chemicznym. W przypadku substancji chemicznych, których badanie nastręcza trudności, rozpuszczalnik można stanowić najlepsze rozwiązanie z technicznego punktu widzenia; należy zapoznać się z wydanym przez OECD »Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures« (22). Wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany chemicznymi właściwościami substancji chemicznej. W wytycznych OECD zaleca się maksymalne stężenie 100 µl/l i do tego zalecenia należy się zastosować. W niedawnym przeglądzie (23) podkreślono jednak dodatkowe obawy związane ze stosowaniem rozpuszczalników do badania funkcjonowania układu hormonalnego. W związku z tym zaleca się, aby w razie konieczności minimalizować stężenie rozpuszczalnika, jeżeli tylko jest to technicznie wykonalne (w zależności od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej).
16. Zastosowany zostanie przepływowy układ badawczy. Układ taki stale dozuje i rozcieńcza roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej (np. pompa dozująca, rozcieńczalnik proporcjonalny, układ nasycalnika) w celu przesyłania szeregu stężeń do komór badawczych. Natężenia przepływów roztworów podstawowych i wody rozcieńczającej należy sprawdzać okresowo, najlepiej codziennie, przez cały okres badania, przy czym nie mogą różnić się one o więcej niż 10 % w trakcie badania. Należy starać się unikać stosowania rur z tworzywa sztucznego niskiej klasy lub innych materiałów, które mogą zwierać aktywne biologicznie substancje chemiczne. Podczas selekcji materiału do przepływowego układu badawczego należy uwzględnić możliwą adsorpcję badanej substancji chemicznej do danego materiału.

Utrzymanie ryb

17. Badane ryby należy wybrać z populacji laboratoryjnej, najlepiej z jednego stada, które przez co najmniej dwa tygodnie przed badaniem było aklimatyzowane w warunkach jakości wody i oświetlenia zbliżonych do stosowanych w badaniu. Ważne jest, aby wskaźnik obciążenia i obsada (definicje można znaleźć w dodatku 1) były odpowiednie dla gatunków użytych do badania (zob. dodatek 2).
18. Po 48-godzinnym okresie adaptacji odnotowuje się przypadki śmiertelności i zastosowanie mają następujące kryteria:
 - śmiertelność przekracza 10 % populacji w ciągu siedmiu dni: należy odrzucić całą partię;
 - śmiertelność na poziomie 5–10 % populacji: aklimatyzacja przez siedem dodatkowych dni; jeżeli śmiertelność przekroczy 5 % w ciągu tych kolejnych siedmiu dni, należy odrzucić całą partię;
 - śmiertelność poniżej 5 % populacji w ciągu siedmiu dni: należy zaakceptować partię.
19. Ryby nie powinny być leczone na żadną chorobę w okresie aklimatyzacji, w okresie poprzedzającym narażenie ani w okresie narażenia.

Okres poprzedzający narażenie i wybór ryb

20. Zaleca się tygodniowy okres poprzedzający narażenie, w którym zwierzęta umieszcza się w naczyniach podobnych do faktycznych naczyń użytych do badania. Ryby należy karmić bez ograniczeń przez cały okres utrzymywania i na etapie narażenia. Etap narażenia rozpoczyna się z wykorzystaniem dorosłych ryb wykazujących dymorfizm płciowy z laboratoryjnego źródła zwierząt dojrzałych płciowo (np. o wyraźnych drugorzędnych cechach płciowych widocznych w przypadku *Pimephales promelas* i ryżanki), oraz wykazujących aktywność tarlową. Zgodnie z ogólną wytyczną (której nie należy stosować w oderwaniu od obserwacji rzeczywistego stanu reprodukcyjnego danej partii ryb) *Pimephales promelas* powinny być w wieku około 20 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 25 ± 2 °C przez całą długość życia. Ryżanki japońskie powinny być w wieku około 16 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 25 ± 2 °C przez całą długość życia. Danio pręgowane powinny być w wieku około 16 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 26 ± 2 °C przez całą długość życia.

PROJEKT BADANIA

21. Stosuje się trzy stężenia badanej substancji chemicznej, jedną próbę kontrolną (z wodą) i, w razie potrzeby, jedną próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem. Dane można analizować w celu określenia statystycznie istotnych różnic między reakcjami w grupie badanej i grupie kontrolnej. Analizy te dostarczą informacji, czy wymagane jest dalsze długoterminowe badanie substancji chemicznej pod kątem negatywnych skutków (mianowicie wpływu na przeżycie, rozwój, wzrost i rozrodczość), czy też badanie takie ma służyć do oceny ryzyka (24).
22. W przypadku danio pręgowanego i ryżanki w 21. dniu badania pobiera się próbkę samców i samic z każdego poziomu zabiegu (5 samców i 5 samic w każdej z dwóch kontrprób) i z grup kontrolnych w celu dokonania pomiaru witellogeniny i, w stosownych przypadkach, drugorzędnych cech płciowych. W przypadku *Pimephales promelas* w 21. dniu narażenia pobiera się próbkę samców i samic (2 samce i 4 samice z każdej z czterech kontrprób i z grup kontrolnych) w celu dokonania pomiaru witellogeniny i drugorzędnych cech płciowych.

Dobór badanych stężeń

23. Do celów niniejszego badania najwyższym stężeniem badanej substancji powinna być wartość maksymalnego tolerowanego stężenia wyznaczonego w badaniu ustalającym zakres lub za pomocą innych danych dotyczących toksyczności, lub 10 mg/l lub wartość maksymalnej rozpuszczalności w wodzie, w zależności od tego, która wartość jest najniższa. Maksymalne tolerowane stężenie definiuje się jako najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej, którego skutkiem jest mniej niż 10 % przypadków śmiertelnych. Przy zastosowaniu tego podejścia zakłada się istnienie empirycznych danych dotyczących ostrych przypadków toksyczności lub innych danych dotyczących toksyczności, na podstawie których można oszacować maksymalne tolerowane stężenie. Oszacowanie MTC może być niedokładne i zazwyczaj wymaga jeszcze oceny według najlepszej fachowej wiedzy osoby wykonującej badanie.
24. Wymagane są trzy badane stężenia, które różnią się o taką samą wielokrotność nieprzekraczającą 10, oraz próba kontrolna z wodą rozcieńczającą (oraz, w razie potrzeby, z rozpuszczalnikiem). Zaleca się współczynnik rozstawienia stężeń wynoszący od 3,2 do 10.

PROCEDURA

Wybór i ważenie ryb użytych do badania

25. Istotne jest, aby zminimalizować zmienność masy ryb na początku badania. Odpowiedni zakres wielkości dla różnych gatunków zalecanych do wykorzystania w tym badaniu podano w dodatku 2. W odniesieniu do całej partii ryb wykorzystanych w badaniu zakres poszczególnych mas samców i samic ryb na początku badania należy w miarę możliwości utrzymać w zakresie $\pm 20\%$ średniej arytmetycznej masy dla tej samej płci. Zaleca się zważenie próbki ze stada ryb przed rozpoczęciem badania w celu oszacowania średniej masy.

Warunki narażenia*Czas trwania*

26. Czas trwania badania, następujący po okresie poprzedzającym narażenie, wynosi 21 dni. Zalecany okres poprzedzający narażenie wynosi tydzień.

Karmienie

27. Ryby należy karmić bez ograniczeń, podając odpowiedni pokarm (dodatek 2), w porcjach wystarczających do utrzymania stanu fizycznego. Należy starać się zapobiegać rozwojowi mikroorganizmów i mętności wody. Zgodnie z ogólną wytyczną dzienną dawkę pokarmową można podzielić na dwie lub trzy równe porcje podawane w kilku karmieniach dziennie w odstępach co najmniej trzech godzin między karmieniami. Dopuszczalna jest jedna większa dawka, w szczególności w weekendy. Karmienia ryb należy zaprzestać na 12 godzin przed pobraniem próbek/autopsją.
28. Paszę dla ryb należy ocenić pod kątem obecności zanieczyszczeń, takich jak pestycydy chloroorganiczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), polichlorowane bifenyle (PCB). Należy unikać pokarmów o podwyższonej zawartości fitoestrogenów, które mogłyby zakłócić w badaniu reakcję na znanego agonistę estrogenu (np. 17β -estradiol).
29. Niezjedzony pokarm i odchody należy usuwać z naczyń badawczych co najmniej dwa razy w tygodniu, np. ostrożnie czyszcząc dno każdego zbiornika za pomocą syfonu.

Światło i temperatura

30. Fotoperiod i temperatura wody muszą być odpowiednie dla badanego gatunku (zob. dodatek 2).

Częstotliwość analitycznych oznaczeń i pomiarów

31. Przed rozpoczęciem okresu narażenia należy upewnić się, że system podawania substancji chemicznej działa prawidłowo. Należy ustalić wszystkie potrzebne metody analityczne, w tym zgromadzić dostateczną wiedzę na temat stabilności układu badawczego. W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w regularnych odstępach czasu w następujący sposób: natężenia przepływów rozcieńczalnika i roztworu podstawowego substancji toksycznej należy sprawdzać najlepiej codziennie, a co najmniej dwa razy na tydzień, przy czym nie powinny one różnić się o więcej niż 10% przez cały okres trwania badania. Zaleca się, aby faktyczne stężenia badanej substancji chemicznej mierzyć we wszystkich naczyniach na początku badania, a następnie w odstępach tygodniowych.
32. Zaleca się, aby wyniki były oparte na mierzonych stężeniach. Jeżeli jednak stężenie badanej substancji chemicznej w roztworze można z powodzeniem utrzymywać w zakresie $\pm 20\%$ nominalnego stężenia przez okres badania, wówczas wyniki mogą opierać się albo na wartościach nominalnych, albo na wartościach pomiarowych.
33. Próbkę mogą wymagać przefiltrowania (np. przez filtr z porami o średnicy $0,45\ \mu\text{m}$) lub odwirowania. Jeżeli jest to konieczne, wówczas zalecaną procedurą jest odwirowanie. Jeżeli jednak badany materiał nie ulega adsorpcji na filtrze, dopuszczalna jest też filtracja.

34. Podczas badania we wszystkich naczyniach badawczych co najmniej raz na tydzień należy zmierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu, temperaturę i pH. Całkowitą twardość i zasadowość należy mierzyć w próbach kontrolnych i w jednym naczyniu przy najwyższym stężeniu co najmniej raz na tydzień. Zalecane jest stałe monitorowanie temperatury w co najmniej jednym naczyniu badawczym.

Obserwacje

35. W czasie trwania badania albo po jego zakończeniu ocenia się szereg reakcji ogólnych (np. przeżycie) i podstawowych reakcji biologicznych (np. poziomy witellogeniny). Procedurę pomiaru i oceny tych punktów końcowych i ich przydatność opisano poniżej.

Przeżycie

36. W okresie badania ryby należy badać codziennie i odnotowywać wszelkie przypadki śmiertelne, zaś martwe ryby należy jak najszybciej usuwać. Martwych ryb nie należy zastępować nowymi ani w naczyniu kontrolnym, ani w naczyniu z badaną substancją. Płec ryb, które padają w trakcie badania, należy ustalić poprzez makroskopową ocenę gonad.

Zachowanie i wygląd

37. Należy odnotować wszelkie przypadki nietypowego zachowania (w porównaniu z grupami kontrolnymi), które mogą obejmować oznaki ogólnej toksyczności, w tym hiperwentylację, nieskoordynowane pływanie, utratę równowagi i nietypowy spokój lub nietypowy sposób żerowania. Dodatkowo należy odnotować anomalie zewnętrzne (takie jak krwotok, sinica). Do takich oznak toksyczności należy podchodzić ostrożnie podczas interpretacji danych, ponieważ mogą one wskazywać na stężenia, przy których biomarkery aktywności hormonalnej nie są wiarygodne. Takie obserwacje zachowania mogą również dostarczyć przydatnych informacji jakościowych na potrzeby potencjalnych przyszłych wymogów dotyczących badań ryb. Na przykład zaobserwowano agresję terytorialną u normalnych samców lub zmaskulinizowanych samic *Pimephales promelas* po narażeniu na substancję o działaniu androgennym; u danio przegowanego charakterystyczne zachowania związane z kryciem i tarłem po pojawieniu się światła o brzasku ulegają ograniczeniu lub zmniejszeniu wskutek narażenia na substancję o działaniu estrogennym i antyandrogennym.
38. Ponieważ niektóre aspekty wyglądu (przede wszystkim zabarwienie) mogą zmieniać się szybko w zależności od sposobu postępowania, ważne jest, aby obserwacji jakościowych dokonywać przed usunięciem zwierząt z układu badawczego. Jak wynika z dotychczasowych doświadczeń z *Pimephales promelas*, niektóre substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego mogą początkowo wywoływać zmiany w następujących cechach zewnętrznych: zabarwieniu ciała (jasne albo ciemne), wzorze zabarwienia (występowanie pionowych pręg) i kształcie ciała (głowa i obszar piersiowy). Dlatego też wygląd fizyczny ryb należy obserwować w trakcie badania i po jego zakończeniu.

Humanitarne uśmiercanie ryb

39. W 21. dniu, tj. po zakończeniu narażenia, ryby należy uśpić, podając im odpowiednie ilości trikainy (metanosulfonianu trikainy, MS-222 (CAS 886-86-2) 100–500 mg/l buforowanej 300 mg/l NaHCO₃ (wodorowęglanu sodu, CAS 144-55-8) w celu ograniczenia podrażnienia błon śluzowych; następnie pobiera się próbki krwi lub tkanek w celu oznaczenia witellogeniny, jak wyjaśniono w części dotyczącej witellogeniny.

Obserwacja drugorzędnych cech płciowych

40. Niektóre substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego mogą wywoływać zmiany w wyspecjalizowanych drugorzędnych cechach płciowych (liczbie guzków godowych u *Pimephales promelas*, procesie tworzenia się brodawek u samców ryzanki). Zwłaszcza substancje chemiczne o określonym charakterze działania mogą powodować nietypowe pojawianie się drugorzędnych cech płciowych u zwierząt przeciętnej płci; na przykład substancje będące agonistami receptorów androgenowych, takie jak trenbolon, metylotestosteron i dihydrotestosteron, mogą spowodować powstawanie u samic *Pimephales promelas* widocznych guzków godowych lub tworzenie się brodawek u samic ryzanki (11, 20, 21). Odnotowano również, że agonści receptori estrogenowych mogą zmniejszać liczebność guzków godowych i wielkość wyściółki tłuszczowej na grzbiecie u dorosłych samców (25, 26). Takie całościowe obserwacje morfologiczne mogą również dostarczyć przydatnych informacji ilościowych i jakościowych na potrzeby potencjalnych przyszłych wymogów dotyczących badań ryb. Liczbę i wielkość guzków godowych u *Pimephales promelas* i procesów tworzenia się brodawek u ryzanki można określić ilościowo bezpośrednio albo, co jest bardziej praktycznym sposobem, u utrwalonych okazów. Zalecane procedury oceny drugorzędnych cech płciowych u *Pimephales promelas* i ryzanki można znaleźć odpowiednio w dodatkach 5A i 5B.

Witellogenina (VTG)

41. Krew pobiera się z tętnicy/żyły ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną lub ewentualnie przez nakłucie serca za pomocą strzykawki. W zależności od wielkości ryby objętość krwi, jaką można pobrać, wynosi zwykle 5–60 µl na osobnika w przypadku *Pimephales promelas* i 5–15 µl na osobnika w przypadku danio przegowanego. Osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie i przechowuje z inhibitorami proteaz w temperaturze – 80 °C do czasu przeprowadzenia analizy pod kątem witellogeniny. Alternatywnym źródłem tkanki do oznaczenia witellogeniny u ryżanki będzie wątroba, zaś u danio przegowanego można wykorzystać homogenat głowy/ogona (dodatek 6). Pomiar VTG powinien opierać się na zweryfikowanej homologicznej metodzie ELISA, w której wykorzystuje się homologiczną normę VTG i homologiczne przeciwciała. Zaleca się stosowanie metody pozwalającej na wykrycie poziomów VTG wynoszących zaledwie kilka ng/ml osocza (lub ng/mg tkanki), co stanowi poziom tła w przypadku samców ryb nienarażonych na działanie substancji.
42. Kontrola jakości analizy poziomu witellogeniny zostanie przeprowadzona z wykorzystaniem norm, prób ślepych i przynajmniej analiz powtórnych. W przypadku każdej metody ELISA należy przeprowadzić test na wpływ matrycy (wpływ rozcieńczenia próbki) w celu oznaczenia minimalnego współczynnika rozcieńczenia próbki. Każda płytka do testu ELISA wykorzystana do badań VTG powinna zawierać następujące próbki kontroli jakości: co najmniej 6 wzorców kalibracyjnych obejmujących zakres oczekiwanych stężeń witellogeniny i co najmniej jedną niespecyficzną wiążącą próbę ślepą (poddawaną analizom powtórny). Absorbancja tych prób ślepych powinna wynosić poniżej 5 % maksymalnej absorbancji wzorca kalibracyjnego. Analizę przeprowadza się dla co najmniej dwóch podwielokrotności (zduplikowane studzienki) każdej rozcieńczonej próbki. Zduplikowane studzienki, które różnią się o więcej niż 20 %, należy poddać ponownej analizie.
43. Współczynnik korelacji (R^2) w przypadku krzywych kalibracyjnych powinien być wyższy niż 0,99. Wysoka korelacja nie jest jednak wystarczająca, aby zagwarantować odpowiednią prognozę stężenia we wszystkich zakresach. Oprócz wystarczająco wysokiej korelacji dla krzywej kalibracyjnej stężenie każdego wzorca, obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej, powinno mieścić się w przedziale 70–120 % stężenia nominalnego. Jeżeli stężenia nominalne oddalają się od kalibracyjnej linii regresji (np. przy niższych stężeniach), konieczny może być podział krzywej kalibracyjnej na zakresy niskie i wysokie lub zastosowanie modelu nieliniowego, aby odpowiednio dopasować dane dotyczące absorbancji. Jeżeli krzywa zostanie podzielona, oba odcinki linii powinny mieć $R^2 > 0,99$.
44. Granicę wykrywalności definiuje się jako najniższe stężenie wzorca analitycznego, a granicę oznaczalności definiuje się jako najniższe stężenie wzorca analitycznego pomnożone przez najniższy współczynnik rozcieńczenia.
45. Każdego dnia, w którym przeprowadza się badania witellogeniny, zostanie przeanalizowana próbka wzmocniona przygotowana z zastosowaniem międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego (dodatek 7). Stosunek oczekiwanego stężenia do zmierzonego stężenia zostanie odnotowany wraz z wynikami każdego zbioru badań przeprowadzonych w danym dniu.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena reakcji biomarkerów za pomocą analizy wariancji (ANOVA)

46. W celu zidentyfikowania potencjalnego działania substancji chemicznej zaburzającego funkcjonowanie układu hormonalnego porównuje się reakcje grup badanych i grup kontrolnych z zastosowaniem analizy wariancji (ANOVA). W przypadku wykorzystania próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem należy przeprowadzić odpowiedni test statystyczny dla próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą i próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem w odniesieniu do każdego punktu końcowego. Wytyczne na temat wykorzystania danych dotyczących próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą i próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem w późniejszej analizie statystycznej można znaleźć w OECD, 2006c (27). Wszystkie dane na temat reakcji biologicznej należy analizować i odnotowywać oddzielnie dla każdej płci. Jeśli wymagane założenia dotyczące metod parametrycznych nie zostaną spełnione – rozkład nienormalny (np. test Shapiro-Wilka) lub niejednorodna wariancja (test Bartletta lub Levene'a), należy rozważyć przekształcenie danych w celu ujednorodnienia wariancji przed przeprowadzeniem ANOVA lub ważonej ANOVA. W przypadku niemonotonicznej zależności dawka-odpowiedź można zastosować test Dunnetta (parametryczny) wielokrotnych porównań w parach lub test Manna-Whitneya z korektą Bonferroniego (nieparametryczny). Inne testy statystyczne (np. test Jonckheere'a-Terpstry lub test Williamsa) można zastosować, jeżeli zależność dawka-odpowiedź jest w przybliżeniu monotoniczna. W dodatku 8 przedstawiono schemat statystyczny, który ma pomóc w wyborze najodpowiedniejszego testu statystycznego. Dodatkowe informacje można również znaleźć w dokumencie OECD »Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data« (27).

Sprawozdania z wyników testów

47. Dane uzyskane w ramach badania powinny obejmować poniższe informacje.

Placówka badawcza:

- informacje na temat odpowiedzialnych pracowników i ich obowiązków w zakresie badań;
- każde laboratorium powinno wykazać się biegłością w stosowaniu szeregu reprezentatywnych substancji chemicznych.

Badana substancja chemiczna:

- charakterystyka badanej substancji chemicznej;
- właściwości fizyczne i stosowne właściwości fizykochemiczne;
- metody i częstotliwość przygotowywania badanych stężeń;
- informacje dotyczące stabilności i biodegradowalności.

Rozpuszczalnik:

- charakterystyka rozpuszczalnika (charakter, wykorzystane stężenie);
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika (jeśli jest inny niż woda).

Zwierzęta użyte do badania:

- gatunek i szczerp;
- dostawca i określony zakład dostawcy;
- wiek ryb na początku badania i stan reprodukcyjny/okres tarła;
- szczegóły dotyczące procedur aklimatyzacji zwierząt;
- masa ciała ryb na początku okresu narażenia (na podstawie próbki ze stada ryb).

Warunki badania:

- zastosowana procedura badawcza (rodzaj badania, wskaźnik obciążenia, obsada itd.);
- metoda przygotowania roztworów podstawowych i natężenie przepływu;
- badane stężenia nominalne, cotygodniowo mierzone stężenia roztworów do badań i zastosowana metoda analityczna, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe w naczyniach badawczych, a także dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w prawdziwym roztworze;
- charakterystyka wody rozcieńczającej (w tym pH, twardość, zasadowość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego, całkowity węgiel organiczny, zawiesina i wszelkie inne wykonane pomiary);
- jakość wody w naczyniach badawczych: pH, twardość, temperatura i stężenie rozpuszczonego tlenu;
- szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, jego źródło, podana ilość i częstotliwość podawania oraz analiza pod kątem odpowiednich zanieczyszczeń (np. PCB, WWA oraz pestycydów chloroorganicznych), jeżeli jest dostępna.

Wyniki:

- dowód, że próby kontrolne spełniają kryteria akceptacji badania;
- dane na temat śmiertelności występującej w jakimkolwiek z badanych stężeń i jakiegokolwiek próbie kontrolnej;
- zastosowane techniki statystyczno-analityczne, przetwarzanie danych i uzasadnienie zastosowanych technik;
- dane dotyczące biologicznych obserwacji morfologii makroskopowej, z uwzględnieniem drugorzędnych cech płciowych i witellogeniny;
- wyniki analiz danych, przedstawione najlepiej w formie tabelarycznej i graficznej;
- przypadki wszystkich nietypowych reakcji ryb i wszystkie widoczne efekty spowodowane przez badaną substancję chemiczną.

WYTYCZNE DOTYCZĄCE INTERPRETACJI I AKCEPTACJI WYNIKÓW BADANIA

48. W niniejszej części przedstawiono kilka kwestii, które należy uwzględnić przy interpretacji wyników badania w odniesieniu do różnych zmierzonych punktów końcowych. Wyniki te należy interpretować ostrożnie, ilekroć wydaje się, że badana substancja chemiczna powoduje widoczną toksyczność lub wpływa na ogólny stan badanego zwierzęcia.
49. Ustalając zakres badanych stężeń, należy dołożyć starań, aby nie przekroczyć maksymalnego tolerowanego stężenia i umożliwić miarodajną interpretację danych. Ważne jest, aby otrzymać co najmniej jedną próbę poddaną zabiegowi, w której nie ma oznak skutków toksycznych. Oznaki choroby i skutków toksycznych należy dokładnie ocenić i odnotować. Możliwe jest na przykład, że na wytwarzanie VTG u samic mogą również wpływać ogólna toksyczność i niehormonalne sposoby działania toksycznego, np. hepatotoksyczność. Interpretację skutków mogą jednak wzmocnić inne poziomy zabiegu, których nie zakłóci toksyczność ogólnoustrojowa.
50. Istnieje kilka aspektów, które należy rozważyć do celów akceptacji wyników badania. Jako wytyczną można przyjąć, że poziomy VTG w grupach kontrolnych samców i samic powinny być odmienne i powinny się różnić o około trzy rzędy wielkości w przypadku *Pimephales promelas* i danio przegowanego oraz o około jeden rząd wielkości w przypadku ryżanki. Przykłady zakresu wartości osiągniętych w grupach kontrolnych i badanych są dostępne w sprawozdaniach z weryfikacji (1, 2, 3, 4). Wysokie wartości VTG u samców w grupie kontrolnej mogą zakłócić czułość badania i jego zdolność do wykrywania słabych agonistów estrogenów. Niskie wartości VTG u samic w próbie kontrolnej mogą zakłócić czułość badania i jego zdolność do wykrywania inhibitorów aromatazy i agonistów estrogenów. Do opracowania tej wytycznej wykorzystano badania weryfikacyjne.
51. Jeżeli laboratorium nie przeprowadzało jeszcze takiego badania albo wprowadzono istotne zmiany w badaniu (takie jak zmiana gatunku lub dostawcy ryb), zaleca się przeprowadzenie badania biegłości technicznej. Zaleca się stosowanie substancji chemicznych, które mają wiele różnych sposobów działania lub wpływają na wiele punktów końcowych badania. W praktyce zachęca się każde laboratorium do zgromadzenia własnych historycznych danych kontrolnych w odniesieniu do samców i samic oraz do przeprowadzenia kontroli dodatniej pod kątem działania estrogennego (np. 17 β -estradiolu w stężeniu 100 ng/l lub znanego słabego agonisty), które prowadzi do podwyższenia poziomu VTG u samców ryb, kontroli dodatniej pod kątem zahamowania aromatazy (np. fadrozolu lub prochlorazu w stężeniu 300 μ g/l), które prowadzi do zmniejszenia poziomu VTG u samic ryb, oraz kontroli dodatniej pod kątem działania androgenowego (np. 17 β -trenbolonu w stężeniu 5 μ g/l), które prowadzi do wykształcenia drugorzędnych cech płciowych u samicy *Pimephales promelas* i ryżanki. Aby zagwarantować biegłość laboratorium, wszystkie te dane można porównać z danymi dostępnymi z badań weryfikacyjnych (1, 2, 3).
52. Zasadniczo pomiary witellogeniny należy uznać za dodatnie, jeżeli występuje statystycznie istotny wzrost poziomu VTG u samców ($p < 0,05$) lub statystycznie istotny spadek poziomu u samic ($p < 0,05$) przynajmniej przy najwyższej badanej dawce w porównaniu z grupą kontrolną i przy braku oznak ogólnej toksyczności. Wynik dodatni jest poparty ponadto wykazaniem biologicznie wiarygodnej zależności między dawką a krzywą odpowiedzi. Jak już wspomniano, spadek poziomu witellogeniny może nie mieć wyłącznie hormonalnego pochodzenia; wynik dodatni należy jednak zasadniczo interpretować jako dowód na działanie zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego *in vivo* i powinien on zwykle stanowić bodziec do podjęcia działań w celu dalszego wyjaśnienia.

BIBLIOGRAFIA

- (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). Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 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> (18/09/08).

- (5) Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Nieopublikowane sprawozdanie z dnia 15 grudnia 2007 r. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych, Waszyngton DC. 104 s.
- (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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter i Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*; 103 suplement 7:173–8 Review.
- (8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68 (3):277–91.
- (9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343–52.
- (10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*; 67(1):121–30.
- (11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11–21.
- (12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113–25.
- (13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG odniesienie do raportu z badania AQ001. CEFIC, Bruksela, Belgia.
- (14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217–232.
- (15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119–131.
- (16) Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531–539.
- (17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; tom 21: 1699–1708.
- (18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang JJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K., 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.
- (19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M i Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301–308.
- (20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22 (6): 1350–60.

- (21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23 (3):774–81.
 - (22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa. Seria dotycząca badań i oceny. nr 23. Paryż.
 - (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; s. 69–92.
 - (24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as »signposts,« not »traffic lights«, in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*;114 Suppl 1:106-14.
 - (25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129–145.
 - (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve i 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 54. ENV/JM/MONO(2006)18.
 - (28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (zmieniony). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 150. ENV/JM/MONO(2012)22.
-

*Dodatek 1***Skróty i definicje**

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV: współczynnik zmienności.

ELISA: test immunoenzymatyczny.

Wskaźnik obciążenia: mokra masa ryb na objętość wody.

Obsada: liczba ryb na objętość wody.

VTG (witellogenina): fosfolipidoglikoproteinowy prekursor białek żółtka jajka występujący zwykle u aktywnych płciowo samic wszystkich gatunków jajorodnych.

Oś HPG: oś podwzgórze-przysadka-gonady.

MTC: maksymalne tolerowane stężenie, stanowiące około 10 % LC₅₀.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Warunki doświadczalne badania przesiewowego układu hormonalnego ryb

1. Zalecany gatunek	<i>(Pimephales promelas)</i>	Ryżanka japońska (<i>Oryzias latipes</i>)	Danio pręgowany (<i>Danio rerio</i>)
2. Rodzaj badania	Przepływowe	Przepływowe	Przepływowe
3. Temperatura wody	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Jakość oświetlenia	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)
5. Natężenie światła	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (po- ziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)
6. Fotoperiod (fazy brza- sku/zmierzchu są fa- kultatywne, nie są jed- nak uważane za nie- zbędne)	16 godzin światła, 8 godzin bez dostępu światła	12–16 godzin światła, 12– 8 godzin bez dostępu światła	12–16 godzin światła, 12–8 godzin bez dostępu światła
7. Wskaźnik obciążenia	< 5 g na l	< 5 g na l	< 5 g na l
8. Wielkość komory badawczej	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Objętość roztworu do badań	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Wymiana objętości roztworów do badań	Minimum 6 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie
11. Wiek organizmów użytych do badania	Zob. pkt 20	Zob. pkt 20	Zob. pkt 20
12. Przybliżona mokra masa dorosłych ryb (g)	Samice: 1,5 ± 20 % Samce: 2,5 ± 20 %	Samice: 0,35 ± 20 % Samce: 0,35 ± 20 %	Samice: 0,65 ± 20 % Samce: 0,4 ± 20 %
13. Liczba ryb na naczyn- ie badawcze	6 (2 samce i 4 samice)	10 (5 samców i 5 samic)	10 (5 samców i 5 samic)
14. Liczba zabiegów	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)
15. Liczba naczyń na za- bieg	Minimum 4	Minimum 2	Minimum 2
16. Liczba ryb na badane stężenie	16 dorosłych samic i 8 samców (4 samice i 2 samce w każdym naczyniu z kontrpróbą)	10 dorosłych samic i 10 samców (5 samic i 5 sam- ców w każdym naczyniu z kontrpróbą)	10 dorosłych samic i 10 samców (5 samic i 5 sam- ców w każdym naczyniu z kontrpróbą)

17. Schemat żywienia	Żywe lub zamrożone dorosłe solowce lub naupliusy dwa lub trzy razy dziennie (bez ograniczeń), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów	Naupliusy solowca dwa lub trzy razy dziennie (bez ograniczeń), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów	Naupliusy solowca dwa lub trzy razy dziennie (bez ograniczeń), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów
18. Napowietrzanie	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia
19. Woda rozcieńczająca	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorynowana woda wodociągowa	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorynowana woda wodociągowa	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorynowana woda wodociągowa
20. Okres poprzedzający narażenie	Zaleca się 7 dni	Zaleca się 7 dni	Zaleca się 7 dni
21. Czas trwania narażenia na substancję chemiczną	21 dni	21 dni	21 dni
22. Biologiczne punkty końcowe	przeżywalność zachowanie drugorzędne cechy płciowe VTG	przeżywalność zachowanie drugorzędne cechy płciowe VTG	przeżywalność zachowanie VTG
23. Akceptowalność badania	Rozpuszczony tlen > 60 % nasycenia; średnia temperatura 25 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich zmierzonych wartości na każdy poziom zabiegowy.	Rozpuszczony tlen > 60 % nasycenia; średnia temperatura 24 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich zmierzonych wartości na każdy poziom zabiegowy.	Rozpuszczony tlen > 60 % nasycenia; średnia temperatura 26 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich zmierzonych wartości na każdy poziom zabiegowy.

Dodatek 3

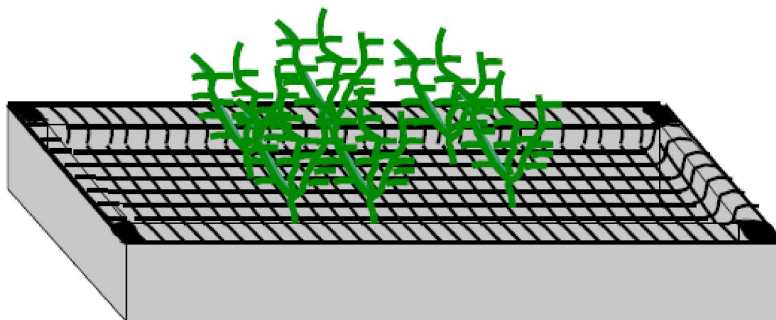
Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej

Składnik	Stężenia
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Pestycydy fosforoorganiczne ogółem	< 50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych plus polichlorowanych bifenyli	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

Dodatek 4a

Podłoże tarłowe dla danio pręgowanego

Tacka na ikrę: naczynie na narzędzia w całości wykonane ze szkła na przykład o wymiarach $22 \times 15 \times 5,5$ cm ($D \times S \times W$), przykryte zdejmowaną pokrywą z siatki z drutu ze stali nierdzewnej (oczka o średnicy 2 mm). Siatka powinna przykrywać naczynie na narzędzia tak, aby zachodziła poniżej krawędzi.



Do siatki należy przymocować podłoże tarłowe. Powinno ono stworzyć strukturę, w którą mogą wpłynąć ryby. Odpowiednie są na przykład sztuczne rośliny akwariowe wykonane z zielonego tworzywa sztucznego (uwaga: należy uwzględnić możliwą adsorpcję badanej substancji chemicznej do tworzywa sztucznego). Należy wypłukać tworzywo sztuczne w wystarczającej ilości ciepłej wody przez wystarczająco długi czas, aby upewnić się, że żadne substancje chemiczne nie zostaną uwolnione do wody wykorzystanej do badania. W przypadku zastosowania materiałów szklanych należy dopilnować, aby ryby nie odniosły obrażeń ani nie były stłoczone w trakcie aktywności tarłowej.

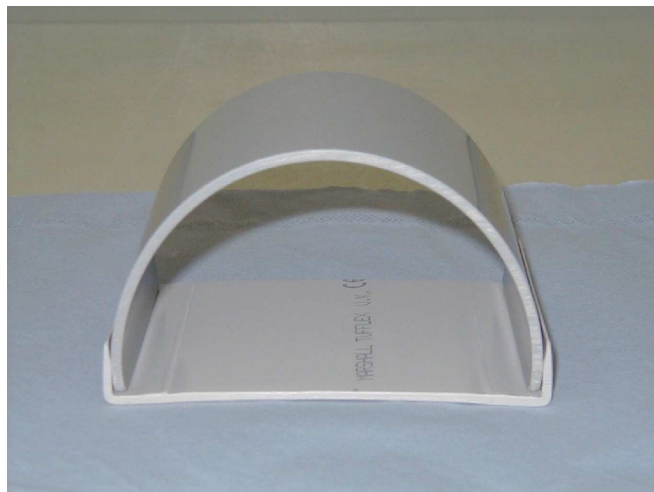
Odległość między tacką i szklanymi szybami powinna wynosić co najmniej 3 cm, aby mieć pewność, że tarło nie odbywa się poza tacką. Komórki jajowe złożone na tackę spadają przez siatkę i po upływie 45–60 minut od rozpoczęcia naświetlania można pobrać próbki. Przezroczyste komórki jajowe nie są lepkie i można je łatwo policzyć, używając światła poprzecznego. Jeżeli zastosowano pięć samic na naczyniu, liczebność komórek jajowych na poziomie do 20 dziennie można uznać za niską, do 100 za średnią i powyżej 100 za wysoką. Tackę na ikrę należy wyjąć, zebrać komórki jajowe, a następnie ponownie umieścić tackę w naczyniu badawczym jak najpóźniej wieczorem albo bardzo wcześnie rano. Czas do ponownego umieszczenia tacki nie powinien przekraczać jednej godziny, w przeciwnym razie bodźce z podłoża tarłowego mogą wywołać indywidualne tarło i złożenie ikry w nietypowym czasie. Jeżeli okoliczności wymagają późniejszego wprowadzenia tacki na ikrę, należy to zrobić co najmniej 9 godzin po rozpoczęciu naświetlania. O tak później porze dnia nie można już wywołać tarła.

Dodatek 4B

Podłoże tarłowe dla *Pimephales promelas*

Dwie lub trzy połączone płytki i tacki na ikrę wykonane z tworzywa sztucznego, ceramiczne, szklane lub ze stali nierdzewnej umieszcza się w każdej komorze badawczej (np. szara półkolistą rynną o długości 80 mm umieszczoną na tacce z wygiętymi krawędziami o długości 130 mm) (zob. rysunek). Wykazano, że na podłoże tarłowe nadają się odpowiednio przygotowane płytki z polichlorku winylu lub ceramiczne (Thorpe i in., 2007).

Zaleca się, aby płytki były oszlifowane, w celu zapewnienia lepszej przyczepności. Tacka powinna być również osłonięta, aby ryby nie miały dostępu do złożonej ikry, chyba że wykazano wysoką przyczepność zastosowanego podłoża tarłowego dla ikry.



Podstawę zaprojektowano tak, aby pomieściła wszystkie komórki jajowe, które nie przyczepią się do powierzchni płytki i w związku z tym spadłyby na dno zbiornika (lub komórki jajowe złożone bezpośrednio na płaską podstawę z tworzywa sztucznego). Przed zastosowaniem wszystkie podłoża tarłowe należy płukać przez co najmniej 12 godzin w wodzie rozcieńczającej.

BIBLIOGRAFIA

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.

Dodatek 5 A

Ocena drugorzędnych cech płciowych u *Pimephales promelas* w celu wykrycia określonych substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego**Zarys ogólny**

Potencjalnie istotne cechy wyglądu fizycznego osobników dorosłych *Pimephales promelas* w badaniu substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego obejmują zabarwienie ciała (tj. jasne/ciemne), wzór zabarwienia (tj. występowanie lub brak pionowych pręg), kształt ciała (tj. kształt głowy i obszaru piersiowego, wyściecie jamy brzusznej) i wyspecjalizowane drugorzędne cechy płciowe (tj. liczba i wielkość guzków godowych, wielkość wyściółki tłuszczowej na grzbiecie i pokładełka).

Guzki godowe znajdują się na głowie (wyściółce grzbietowej) aktywnych rozrodczo samców *Pimephales promelas* i zwykle układają się w dwustronny symetryczny wzór (Jensen i in. 2001). Samice z próby kontrolnej oraz młodociane samce i samice nie wykształcają guzków (Jensen i in. 2001). Wokół oczu i między nozdrzami samców może występować do ośmiu pojedynczych guzków. Największa liczba guzków i największe guzki są rozmieszczone w dwóch równoległych liniach tuż poniżej nozdrzy i powyżej otworu gębowego. U wielu ryb skupiska guzków występują poniżej dolnej szczęki; te, które znajdują się najbliżej otworu gębowego, zwykle występują jako pojedyncza para, zaś te znajdujące się bliżej brzucha mogą obejmować do czterech guzków. Faktyczna liczba guzków rzadko wynosi więcej niż 30 (zakres: 18–28, Jensen i in. 2001). Dominujące guzki (pod względem liczby) pojawiają się jako pojedyncze, relatywnie okrągłe struktury o wysokości w przybliżeniu równej promieniowi. U większości aktywnych rozrodczo samców przynajmniej niektóre guzki są powiększone i wyraźniejsze, tak że nie da się ich odróżnić jako pojedynczych struktur.

Niektóre rodzaje substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego mogą powodować nietypowe pojawianie się drugorzędnych cech płciowych u zwierząt przeciwnej płci; na przykład substancje będące agonistami receptorów androgenowych, takie jak 17 β -metylotestosteron lub 17 β -trenbolon mogą spowodować powstawanie guzków godowych u samic *Pimephales promelas* (Smith 1974; Ankley i in. 2001; 2003), zaś agonisty receptorów estrogenów mogą obniżać liczbę guzków godowych u samców (Miles-Richardson i in. 1999; Harries i in. 2000).

Poniżej znajduje się opis charakterystyki guzków godowych u *Pimephales promelas* opracowany na podstawie procedur stosowanych w laboratorium amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska w Duluth w stanie Minnesota. Poszczególne produkty lub sprzęt można zastąpić dostępnymi porównywalnymi materiałami.

Najlepszy ogląd otrzymuje się, stosując podświetlane szkło powiększające lub mikroskop stereoskopowy 3X z podświetleniem. Ryby należy oglądać od strony grzbietowej i od przodu (głową w kierunku oglądającego).

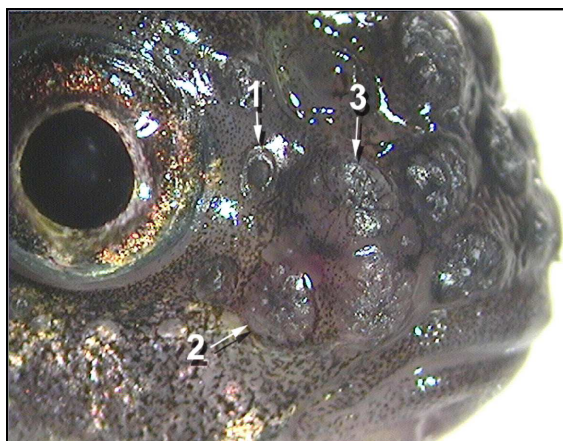
- Umieścić rybę na małej szalce Petriego (np. o średnicy 100 mm), głową do przodu i brzuchem do dołu. Ustawić wizjer tak, aby umożliwić identyfikację guzków. Delikatnie i powoli przekreślać rybę z jednej strony na drugą, aby zidentyfikować obszary z guzkami. Policzyć i ocenić guzki.
- Powtórzyć obserwację na powierzchni głowy po stronie brzusznej, umieszczając rybę na szalce Petriego na grzbiecie, głową do przodu.
- Obserwacje każdej ryby powinny trwać do 2 minut.

Liczenie i ocena guzków

Zidentyfikowano sześć konkretnych obszarów do oceny występowania i rozwoju guzków u osobników dorosłych *Pimephales promelas*. Opracowano szablon do określenia miejsca i liczby występujących guzków (zob. część końcowa niniejszego dodatku). Odnosi się do liczby guzków, a ich wielkość można ocenić ilościowo dla każdego organizmu w następujący sposób: 0 – brak, 1 – występują, 2 – powiększone i 3 – wyraźne (rys. 1).

Ocena 0 – brak jakichkolwiek guzków. Ocena 1 – występują; identyfikacja jakichkolwiek guzków z pojedynczym punktem, którego wysokość jest niemal równa promieniowi (średnicy). Ocena 2 – powiększone; identyfikacja tkanki przypominającej wyglądem gwiazdkę, zwykle mające duży promień podstawy oraz wyźłobienia lub bruzdy wychodzące ze środka. Wysokość guzka jest zwykle bardziej nieregularna, czasami może on być jednak lekko zaokrąglony. Ocena 3 – wyraźne; guzki są zwykle dość duże i zaokrąglone, o mniej określonej strukturze. Niekiedy guzki będą występowały razem, tworząc jednolitą masę wzdłuż jednego obszaru lub kilku obszarów (B, C i D, opisane poniżej). Zabarwienie i wzór są podobne jak w ocenie 2, czasami jednak trudno je rozróżnić. Zastosowanie tego systemu oceny zwykle prowadzi do otrzymania łącznej oceny guzków wynoszącej < 50 u normalnych samców z próby kontrolnej posiadających 18–20 guzków (Jensen i in. 2001).

Rysunek 1



Faktyczna liczba guzków u niektórych ryb może być większa niż liczba rubryk w szablonie (dodatek A) dla danego obszaru oceny. Jeżeli tak się stanie, dodatkowe punkty oceny można zaznaczyć w rubryce lub na prawo lub na lewo od niej. Szablon nie musi być zatem symetryczny. Dodatkową techniką mapowania guzków, które są połączone w pary lub połączone pionowo wzdłuż poziomej płaszczyzny otworu gębowego, może być podwójne zaznaczanie dwóch punktów oceny guzków w jednej rubryce.

Obszary oznaczania:

A – Guzki zlokalizowane wokół oka. Oznaczanie od strony grzbietowej do strony brzusznej wokół przedniej krawędzi oka. Licznie i powszechnie występują u dorosłych samców z próby kontrolnej, nie występują u samic z próby kontrolnej, a u samic narażonych na działanie androgenów zwykle występują w parach (po jednej w pobliżu każdego oka) lub pojedynczo.

B – Guzki zlokalizowane między nozdrzami (porami kanałów sensorycznych). Zwykle występują w parach u samców z próby kontrolnej na wyższych poziomach (2 – powiększone lub 3 – wyraźne). Nie występują u samic z próby kontrolnej, u samic narażonych na działanie androgenów występują i rozwijają się w pewnym stopniu.

C – Guzki zlokalizowane bezpośrednio z przodu nozdrzy, równoległe do otworu gębowego. Zwykle są powiększone lub wyraźne u dojrzałych samców z próby kontrolnej. Występują lub są powiększone u mniej rozwiniętych samców lub samic poddanych działaniu androgenów.

D – Guzki zlokalizowane równoległe wzdłuż linii otworu gębowego. Zwykle oceniane jako rozwinięte u samców z próby kontrolnej. Brak u samic z próby kontrolnej, ale występują u samic narażonych na działanie androgenów.

E – Guzki zlokalizowane na dolnej szczęce, w pobliżu otworu gębowego, zwykle niewielkie i często występujące w parach. Różne u samców z próby kontrolnej lub badanej i samic z próby badanej.

F – Guzki zlokalizowane po stronie brzusznej w kierunku E. Zwykle małe i występujące w parach. Występują u samców z próby kontrolnej i samic poddanych działaniu androgenów.

BIBLIOGRAFIA

- (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.

Szablon dot. guzków**Skala numeryczna**

Nr _____

1 – występują

Data _____

2 – powiększone

Suma ocen _____

3 – wyraźne

	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

Dodatek 5 B

Ocena drugorzędnych cech płciowych u ryzanki w celu wykrycia określonych substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego

Poniżej opisano procedurę pomiaru procesów tworzenia się brodawek (*), które stanowią drugorzędne cechy płciowe u ryzanki (*Oryzias latipes*).

(*) Procesy tworzenia się brodawek zwykle zachodzą wyłącznie u dorosłych samców na promieniach płetw od drugiego do siódmego lub ósmego, licząc od tylnego końca płetwy odbytowej (rys. 1 i 2). Procesy te rzadko zachodzą jednak na pierwszym promieniu płetwy od tylnego końca płetwy odbytowej. Niniejsza standardowa procedura operacyjna obejmuje pomiar procesów na pierwszym promieniu płetwy (numer promienia płetwy w niniejszej procedurze odpowiada ich kolejności, począwszy od tylnego końca płetwy odbytowej).

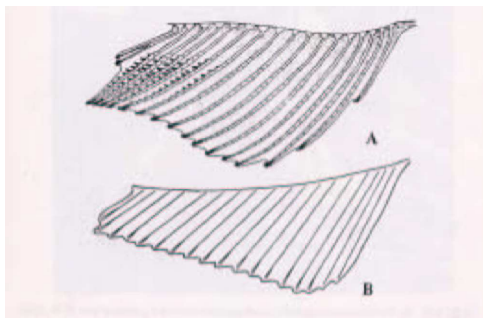
- 1) Po wycięciu wątroby (dodatek 6) zwłoki umieszcza się w probówce stożkowej zawierającej około 10 ml 10 % obojętnej buforowanej formaliny (głową do góry i ogonem do dołu). Jeżeli gonada jest utrwalona w roztworze innym niż 10 % obojętnej buforowanej formaliny, wykonać poprzeczne nacięcie zwłok między przednim obszarem płetwy odbytowej a odbytem za pomocą ostrza, uważając, aby nie uszkodzić gonopora i samej gonady (rys. 3). Umieścić ciało ryby od strony czaszki w roztworze utrwalającym w celu utrwalenia gonady, zaś stronę ogonową – w 10 % obojętnej buforowanej formalinie, jak opisano powyżej.
- 2) Po umieszczeniu ciała ryby w 10 % obojętnej buforowanej formalinie chwycić przedni obszar płetwy odbytowej pęsetą i złożyć ją na około 30 sekund, tak aby płetwa odbytowa pozostała otwarta. Chwytając płetwę odbytową pęsetą, ostrożnie złapać kilka promieni płetwy w przednim obszarze, uważając, aby nie zeskrobać procesów tworzenia się brodawek.
- 3) Po utrzymywaniu otwartej płetwy odbytowej przez około 30 sekund ciało ryby należy umieścić w 10 % obojętnej buforowanej formalinie w temperaturze pokojowej do czasu dokonania pomiaru procesów tworzenia się brodawek (pomiar należy przeprowadzić po utrwaleniu przez co najmniej 24 godziny).

Pomiar

- 1) Po utrwaleniu ciała ryby w 10 % obojętnej buforowanej formalinie przez co najmniej 24 godziny wyjąć zwłoki ryby z probówki stożkowej i wytrzeć formalinę bibułą filtracyjną (lub ręcznikiem papierowym).
- 2) Położyć rybę stroną brzuszną do góry. Następnie ostrożnie odciąć płetwę odbytową za pomocą małych nożyczek chirurgicznych (zaleca się odcięcie płetwy odbytowej wraz z niewielką ilością pterygioforu).
- 3) Chwycić przedni obszar odciętej płetwy odbytowej pęsetą i umieścić na szkiełku z kilkoma kroplami wody. Następnie przykryć płetwę odbytową szkiełkiem nakrywkowym. Należy zachować ostrożność, aby nie zeskrobać procesów tworzenia się brodawek podczas chwytania płetwy odbytowej pęsetą.
- 4) Policzyć płytki łączące, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek, za pomocą licznika pod mikroskopem biologicznym (mikroskopem dolnostolikowym lub odwróconym). Uznaje się, że zachodzą procesy tworzenia się brodawek, jeśli ich niewielkie skupisko jest widoczne na tylnym obrzeżu płytki łączącej. Zapisać liczbę płytek łączących, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek dla każdego promienia płetwy w karcie badania (np. pierwszy promień płetwy: 0, drugi promień płetwy: 10, trzeci promień płetwy: 12 itd.) i wpisać sumę tych liczb dla poszczególnych ryb do arkusza kalkulacyjnego Excel. W razie potrzeby zrobić zdjęcie płetwy odbytowej i policzyć na zdjęciu liczbę płytek łączących, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek.
- 5) Po dokonaniu pomiaru umieścić płetwę odbytową w probówce stożkowej opisanej w (1) i zachować.

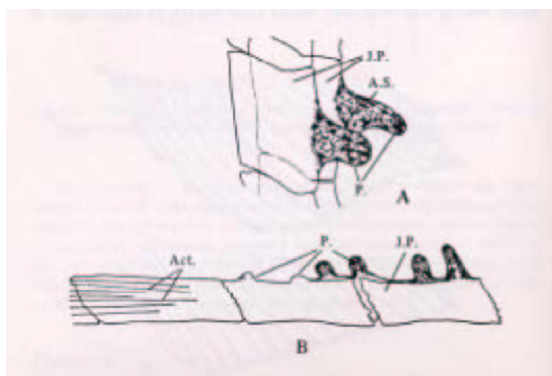
Rys. 1.

Schemat przedstawiający różnice w kształcie i wielkości płetwy odbytowej pomiędzy płciami. A – samiec, B – samica. 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.



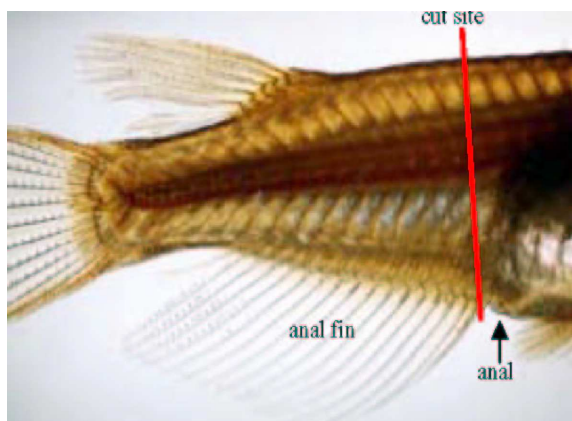
Rys. 2

A – procesy zachodzące na płytkach łączących promienia płetwy odbytowej. J.P. – płytka łącząca (ang. joint plate); A.S. – przestrzeń między osiami (ang. axial space); P. – proces. B – tylny koniec promienia płetwy. Actinotrichia (Act.) znajdują się na zakończeniu. 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.



Rys. 3.

Zdjęcie ciała ryby przedstawiające miejsce odcięcia, w przypadku gdy gonada jest utrwalona w roztworze utrwalającym innym niż 10 % obojętna buforowana formalina. W takim przypadku pozostała część ciała zostanie odcięta pomiędzy przednim obszarem płetwy odbytowej a odbytem za pomocą ostrza (czerwony pasek); część ciała ryby z głową zostanie umieszczona w roztworze utrwalającym dla gonad, natomiast część ciała ryby z ogonem zostanie umieszczona w 10 % obojętnej buforowanej formalinie.



Dodatek 6

Zalecane procedury pobierania próbek do celów analizy witellogeniny

Należy starać się zapobiegać zanieczyszczeniu krzyżowemu między próbkami VTG pobranymi od samców i samic.

Procedura 1A: *Pimephales promelas*, pobieranie krwi z żyły/tętnicy ogonowej

Po znieczuleniu trzon ogona nacina się częściowo ostrzem skalpela i pobiera się krew z żyły/tętnicy ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną. Po pobraniu krwi szybko izoluje się osocze przez odwirowanie przy 15 000 g przez 3 minuty (lub ewentualnie przy 15 000 g przez 10 minut w temperaturze 4 °C). W razie potrzeby po odwirowaniu można oznaczyć hematokryt wyrażony w procentach. Następnie usuwa się osocze z kapilary mikrohematokrytowej i przechowuje w próbówce do wirówki z 0,13 jednostki aprotyny (inhibitor proteaz) w temperaturze – 80 °C, do czasu aż będzie można oznaczyć poziom witellogeniny. W zależności od wielkości *Pimephales promelas* (która jest zależna od płci) objętość osocza, jaką można pobrać, wynosi zwykle 5–60 mikrolitrów na rybę (Jensen i in. 2001).

Procedura 1B: *Pimephales promelas*, pobieranie krwi z serca

Krew można również ewentualnie pobrać przez nakłucie serca za pomocą heparynizowanej strzykawki (1 000 jednostek heparyny na ml). Krew przenosi się następnie do próbek Eppendorfa (trzymanych na lodzie) a następnie odwirowuje (5 min, 7 000 g, temperatura pokojowa). Osocze należy przenieść do czystych próbek Eppendorfa (w podwielokrotnościach, jeżeli pozwala na to objętość osocza) i niezwłocznie zamrozić w temperaturze – 80 °C do czasu przeprowadzenia analizy (Panter i in., 1998).

Procedura 2 A: Ryżanka japońska, wycięcie wątroby u ryżanki

Wyjęcie ryb przeznaczonych do badania z komory badawczej

- 1) Ryby przeznaczone do badania należy wyjąć z komory badawczej za pomocą małego podbieraka. Należy uważać, aby nie wrzucić ryb przeznaczonych do badania do innych komór badawczych.
- 2) Zasadniczo ryby przeznaczone do badania należy wyjmować w następującej kolejności: próba kontrolna, próba kontrolna z rozpuszczalnikami (w stosownych przypadkach), próba z najniższym stężeniem, próba ze średnim stężeniem, próba z najwyższym stężeniem, próba z kontrolą dodatnią. Ponadto z jednej komory badawczej należy najpierw wyjąć wszystkie samce, a dopiero potem samice.
- 3) Płeć każdej z ryb przeznaczonych do badania identyfikuje się na podstawie zewnętrznych drugorzędnych cech płciowych (np. kształtu płetwy odbytowej).
- 4) Rybę przeznaczoną do badania umieścić w pojemniku transportowym i przenieść do stanowiska badawczego w celu wycięcia wątroby. Sprawdzić poprawność etykiet komory badawczej i pojemnika transportowego oraz potwierdzić, że liczba ryb wyjętych z komory badawczej i liczba ryb pozostających w komorze jest zgodna z oczekiwaniami.
- 5) Jeżeli nie można zidentyfikować płci na podstawie wyglądu zewnętrznego ryby, wyjąć wszystkie ryby z komory badawczej. W takim przypadku płeć należy określić przez obserwację gonad lub drugorzędnych cech płciowych pod mikroskopem stereoskopowym.

Wycięcie wątroby

- 1) Przenieść ryby przeznaczone do badania z pojemnika transportowego do roztworu środka znieczulającego za pomocą małego podbieraka.
- 2) Po znieczuleniu przenieść ryby przeznaczone do badania na bibułę filtracyjną (lub ręcznik papierowy) za pomocą pęsety (typu ogólnodostępnego). Chwytać ryby przeznaczone do badania, przyłożyć pęsetę do boków głowy, aby zapobiec złamaniu ogona.
- 3) Wytrzeć wodę z powierzchni ryb bibułą filtracyjną (lub ręcznikiem papierowym).
- 4) Położyć rybę stroną brzuszną do góry. Następnie wykonać małe poprzeczne nacięcie w połowie odległości między brzuszным obszarem szyjnym a środkowym obszarem brzuszным za pomocą nożyczek chirurgicznych.

- 5) Włożyć nożyczki chirurgiczne do niewielkiego nacięcia i rozciąć jamę brzuszną od punktu ogonowego w kierunku pokrywy skrzelowej do odbytu od strony czaszki wzdłuż środkowej linii jamy brzusznej. Należy uważać, aby nie włożyć nożyczek chirurgicznych zbyt głęboko i nie uszkodzić wątroby i gonady.
- 6) Przeprowadzić następujące czynności pod mikroskopem stereoskopowym.
- 7) Położyć rybę przeznaczoną do badania stroną brzuszną do góry na ręczniku papierowym (można również wykorzystać szklaną szalkę Petriego lub szkiełko).
- 8) Rozszerzyć ściany jamy brzusznej pęsetą precyzyjną i wyciągnąć organy wewnętrzne na zewnątrz. W razie potrzeby dopuszcza się również wyjęcie organów wewnętrznych przez usunięcie ścian jamy brzusznej z jednej strony.
- 9) Odsłonić połączoną część wątroby i pęcherzyka żółciowego za pomocą drugiej pęsety precyzyjnej. Następnie chwycić przewód żółciowy i odciąć pęcherzyk żółciowy. Należy uważać, aby nie przerwać ścian pęcherzyka żółciowego.
- 10) Chwycić przełyk i odciąć przewód pokarmowy od wątroby w ten sam sposób. Należy uważać, aby zawartość przewodu pokarmowego nie rozlała się. Odciąć ogonową część przewodu pokarmowego od odbytu i usunąć przewód z jamy brzusznej.
- 11) Odciąć pas tłuszczu i innych tkanek od brzegów wątroby. Należy uważać, aby nie zadrapać wątroby.
- 12) Chwycić za przestrzeń wrotną wątroby za pomocą pęsety precyzyjnej i wyjąć wątrobę z jamy brzusznej.
- 13) Położyć wątrobę na szkiełku. W razie potrzeby należy usunąć z powierzchni wątroby dodatkowy tłuszcz i tkankę obcą (np. powłoki jamy brzusznej) za pomocą pęsety precyzyjnej.
- 14) Zmierzyć masę wątroby wraz z mikroprobówką o pojemności 1,5 ml jako tarą za pomocą elektronicznej wagi analitycznej. Odnotać wartość w karcie badania (odczyt z dokładnością do 0,1 mg). Potwierdzić informacje dotyczące identyfikacji na etykiecie umieszczonej na mikroprobówce.
- 15) Zamknąć mikroprobówkę z wątrobą. Przechowywać ją na statywie chłodzącym (lub w pudełku z lodem).
- 16) Po wycięciu jednej wątroby wyczyścić narzędzia chirurgiczne albo wymienić je na czyste.
- 17) Wyciąć wątroby wszystkich ryb znajdujących się w pojemniku transportowym zgodnie z powyższym opisem.
- 18) Po wycięciu wątroby ze wszystkich ryb znajdujących się w pojemniku transportowym (tj. wszystkich samców lub samic w komorze badawczej) umieścić wszystkie próbki wątroby na statywie z probówkami opatrzonymi etykietą do celów identyfikacji i przechowywać w zamrażarce. W przypadku gdy wątroby przekazuje się do obróbki wstępnej niedługo po wycięciu, przenosi się je do kolejnego stanowiska badawczego na statywie chłodzącym (lub w pudełku z lodem).

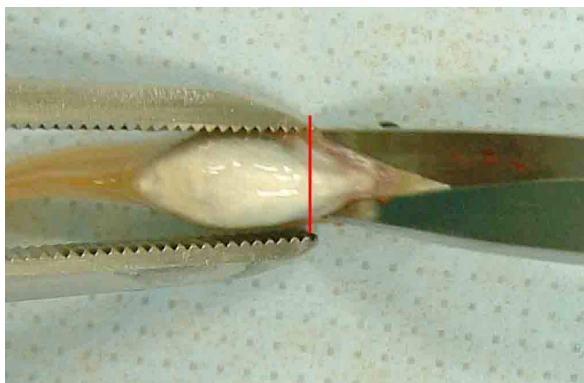
Po wycięciu wątroby można wykonać pomiar drugorzędnych cech płciowych ryb.

Próbka

Przechowywać próbki wątroby pobrane z ryb przeznaczonych do badania w temperaturze $\leq -70^{\circ}\text{C}$, jeżeli nie wykorzystuje się ich do obróbki wstępnej niedługo po wycięciu.

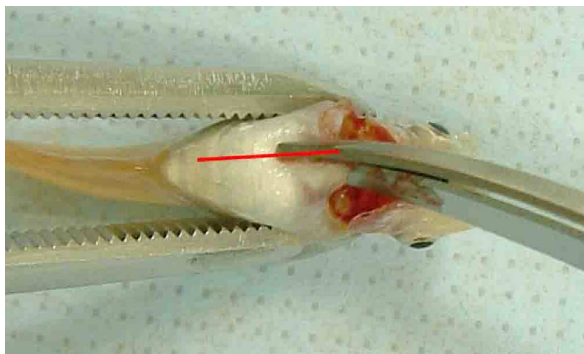
Rys. 1

Nacięcie nożyczkami wykonuje się tuż przed płetwami piersiowymi.



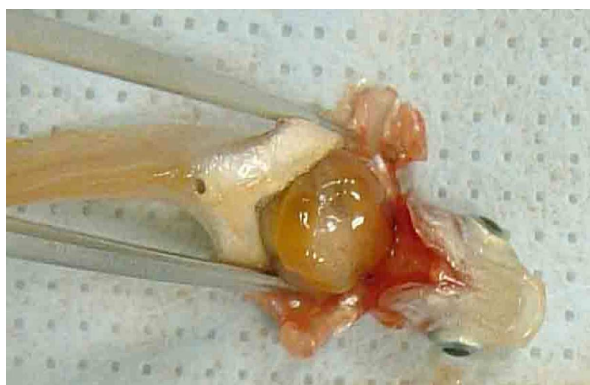
Rys. 2

Środkową linię brzucha nacina się nożyczkami do punktu znajdującego się około 2 mm od odbytu w kierunku czaszki.



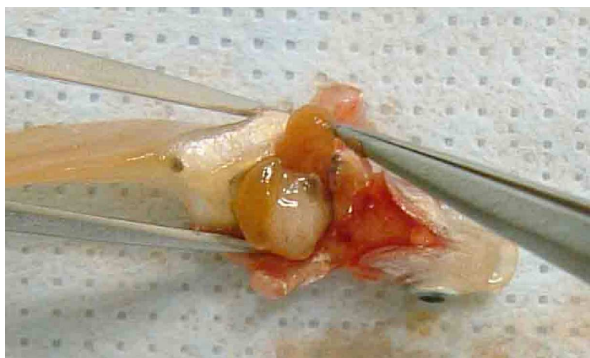
Rys. 3

Ściany jamy brzusznej rozszerza się szczypczykami w celu odsłonięcia wątroby i innych organów wewnętrznych. (Ewentualnie można przytrzymać ściany jamy brzusznej po bokach).



Rys. 4

Wątrobę wyraźnie się izoluje i wycina za pomocą szczypczyków.



Rys. 5

Jelita delikatnie wyciąga się za pomocą szczypczyków.



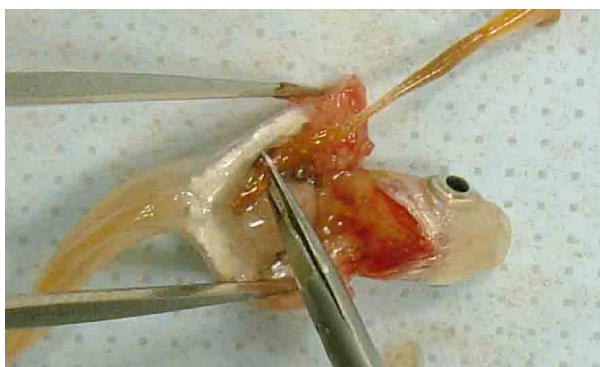
Rys. 6

Oba końce jelit i wszelkie przyczepy krezki odcina się za pomocą nożyczek.



Rys. 7 (samica)

W przypadku samicy stosuje się identyczną procedurę.



Rys. 8

Koniec procedury.**Procedura 2 B: Ryzanka japońska (*Oryzias latipes*), obróbka wstępna wątroby przed analizą poziomu witellogeniny.**

Wziąć butelkę z roztworem buforowym do homogenizacji z zestawu ELISA i schłodzić ją kruszonym lodem (temperatura roztworu: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). W przypadku zastosowania roztworu buforowego do homogenizacji z układu EnBio ELISA rozmrozić roztwór w temperaturze pokojowej, a następnie schłodzić butelkę kruszonym lodem.

Obliczyć objętość roztworu buforowego do homogenizacji wątroby na podstawie jej masy (dodając 50 μl roztworu buforowego do homogenizacji na 1 mg masy wątroby do homogenatu). Na przykład jeżeli masa wątroby wynosi 4,5 mg, objętość roztworu buforowego do homogenizacji wątroby wynosi 225 μl . Przygotować listę objętości roztworu buforowego do homogenizacji dla wszystkich wątrob.

Przygotowanie wątroby do obróbki wstępnej

- 1) Bezpośrednio przed rozpoczęciem obróbki wstępnej wyjąć z zamrażarki mikroprowówkę o pojemności 1,5 ml zawierającą wątrobę.
- 2) Obróbkę wstępną wątroby pobranej od samców należy przeprowadzać przed obróbką wstępną wątroby pobranej od samic, aby zapobiec zanieczyszczeniu witellogeniną. Ponadto obróbkę wstępną badanych grup należy przeprowadzać w następującej kolejności: próba kontrolna, próba kontrolna z rozpuszczalnikiem (w stosownych przypadkach), próba z najniższym stężeniem, próba ze średnim stężeniem, próba z najwyższym stężeniem, próba z kontrolą dodatnią.
- 3) Liczba mikroprowówek o pojemności 1,5 ml z próbkami wątroby, wyjętych jednorazowo z zamrażarki, nie powinna przekraczać liczby, którą można odwirować w tym samym czasie.
- 4) Ułożyć mikroprowówki o pojemności 1,5 ml z próbkami wątroby na statywie chłodzącym w kolejności według numeru próbki (nie ma potrzeby rozmrażania wątroby).

Obróbka wstępna**1. Dodanie roztworu buforowego do homogenizacji**

- 1) Sprawdzić na liście, jaką objętość roztworu buforowego do homogenizacji należy zastosować w przypadku danej próbki wątroby, i wyregulować mikropipetę (zakres objętości: 100–1 000 μl) do odpowiedniej objętości. Przymocować czystą końcówkę do mikropipety.
- 2) Pobrać roztwór buforowy do homogenizacji z butelki z odczynnikami i dodać bufor do mikroprowówki o pojemności 1,5 ml zawierającej wątrobę.
- 3) Dodać roztwór buforowy do homogenizacji do wszystkich mikroprowówek o pojemności 1,5 ml zawierających wątrobę zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Nie ma potrzeby zmieniać końcówki mikropipety na nową. Jeżeli jednak końcówka jest zanieczyszczona lub podejrzewa się, że jest zanieczyszczona, należy ją wymienić.

2. Homogenizacja wątroby

- 1) Przymocować nowy tłuczek do homogenizacji do homogenizatora do mikroprobówek.
- 2) Włożyć tłuczek do mikroprobówki o pojemności 1,5 ml. Przytrzymać homogenizator do mikroprobówek w taki sposób, aby zgnieść wątrobę między powierzchnią tłuczka a wewnętrzną ścianą mikroprobówki o pojemności 1,5 ml.
- 3) Uruchomić homogenizator do mikroprobówek na 10–20 sekund. W tym czasie chłodzić mikroprobówkę o pojemności 1,5 ml kruszonym lodem.
- 4) Wyjąć tłuczek z mikroprobówki o pojemności 1,5 ml i odstawić ją na około 10 sekund. Następnie przeprowadzić kontrolę wzrokową stanu zawiesiny.
- 5) Jeżeli w zawieszynie widoczne są kawałki wątroby, powtórzyć działania (3) i (4), aby otrzymać zadowalający homogenat wątroby.
- 6) Zawieszynę homogenatu wątroby chłodzić na statywie z lodem do czasu odwirowania.
- 7) Do sporządzenia każdego homogenatu użyć nowego tłuczka.
- 8) Przeprowadzić homogenizację wszystkich wątroób z roztworem buforowym do homogenizacji zgodnie z opisaną wyżej procedurą.

3. Odwirowanie zawiesiny homogenatu wątroby

- 1) Upewnić się, że temperatura schłodzonej komory wirówki wynosi $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- 2) Włożyć mikroprobówki o pojemności 1,5 ml zawierające zawieszynę homogenatu wątroby do schłodzonej wirówki (w razie potrzeby wyważając).
- 3) Odwirować zawieszynę homogenatu wątroby przy 13 000 g przez 10 min w temperaturze $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Jeżeli jednak supernatanty są właściwie oddzielone, moc i czas odwirowania można dostosować według potrzeb.
- 4) Po odwirowaniu sprawdzić, czy supernatanty są odpowiednio oddzielone (powierzchnia: lipid, warstwa pośrednia: supernatant, warstwa dolna: tkanka wątroby). Jeżeli oddzielenie nie jest odpowiednie, ponownie odwirować zawieszynę w tych samych warunkach.
- 5) Wyjąć wszystkie próbki ze schładzanej wirówki i ułożyć je na statywie z lodem w kolejności według numeru próbki. Należy uważać, aby po odwirowaniu żadna z oddzielonych warstw nie zawiesiła się ponownie.

4. Zbieranie supernatantu

- 1) Umieścić cztery mikroprobówki do przechowywania supernatantu o pojemności 0,5 ml na statywie na probówki.
- 2) Zebrać 30 μl każdego supernatantu (oddzielonego jako warstwa pośrednia) za pomocą mikropipety i wprowadzić do jednej mikroprobówki o pojemności 0,5 ml. Należy uważać, aby nie zebrać lipidu z powierzchni ani tkanki wątroby z warstwy dolnej.
- 3) Zebrać supernatant i wprowadzić do pozostałych dwóch mikroprobówek o pojemności 0,5 ml w sposób opisany powyżej.
- 4) Zebrać pozostałą część supernatantu za pomocą mikropipety (jeżeli jest to możliwe: $\geq 100 \mu\text{l}$). Następnie wprowadzić supernatant do ostatniej mikroprobówki o pojemności 0,5 ml. Należy uważać, aby nie zebrać lipidu z powierzchni ani tkanki wątroby z warstwy dolnej.
- 5) Zamknąć mikroprobówkę o pojemności 0,5 ml i zapisać na etykiecie objętość supernatantu. Następnie natychmiast schłodzić mikroprobówki na statywie z lodem.
- 6) W przypadku każdego supernatantu wymienić końcówkę mikropipety na nową. Jeżeli do końcówki przyczepi się duża ilość lipidu, należy natychmiast wymienić ją na nową, aby zapobiec zanieczyszczeniu wyciągu z wątroby tłuszczem.

- 7) Cały odwirowany supernatant wprowadzić do czterech mikroprobówek o pojemności 0,5 ml zgodnie z wyżej opisaną procedurą.
- 8) Po wprowadzeniu supernatantu do mikroprobówek o pojemności 0,5 ml umieścić je wszystkie na statywie na probówce z etykietą identyfikacyjną, a następnie natychmiast zamrozić w zamrażarce. Jeżeli stężenia VTG mierzy się natychmiast po obróbce wstępnej, należy schłodzić jedną mikroprobówkę o pojemności 0,5 ml (zawierającą 30 µl supernatantu) na statywie na probówce i przenieść do stanowiska badawczego, gdzie przeprowadza się test ELISA. W takim przypadku umieścić pozostałe mikroprobówki na statywach na probówce i zamrozić w zamrażarce.
- 9) Po zebraniu supernatantu odrzucić pozostałości.

Przechowywanie próbek

Przechowywać mikroprobówki o pojemności 0,5 ml zawierające supernatant z homogenatu wątroby w temperaturze $\leq -70^{\circ}\text{C}$ do czasu wykorzystania ich w teście ELISA.

Procedura 3 A: Danio pręgowany, pobieranie krwi z żyły/tętnicy ogonowej

Natychmiast po znieczuleniu trzon ogona nacina się poprzecznie i pobiera się krew z żyły/tętnicy ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną. Objętość krwi wynosi 5–15 µl, w zależności od wielkości ryby. Do mikrokapilary dodaje się taką samą objętość roztworu buforowego aprotyniny (6 µg/ml w PBS), a osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie (5 minut przy 600 g). Osocze zbiera się w probówkach badawczych i przechowuje w temperaturze -20°C do czasu przeprowadzenia analizy witellogeniny i innych białek, które są przedmiotem zainteresowania.

Procedura 3 B: Danio pręgowany; pobranie krwi przez nakłucie serca

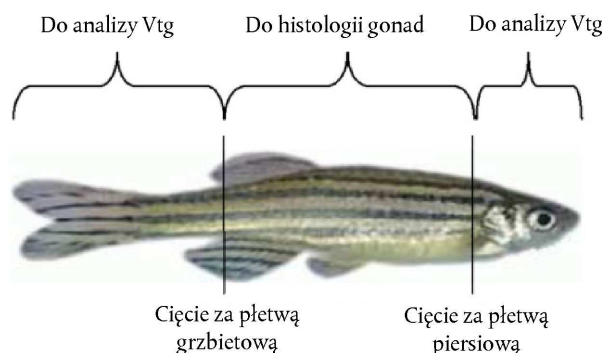
Aby zapobiec krzepnięciu krwi i degradacji białek, próbki pobiera się w roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) zawierającym heparynę (1 000 jednostek/ml) i inhibitor proteaz aprotyninę (2 TIU/ml). Zaleca się, aby roztwór buforowy składał się z soli amonowej heparyny i liofilizowanej aprotyniny. Do pobierania próbek krwi zaleca się używanie strzykawki (1 ml) z cienką igłą (np. Braun Omnikan-F). Strzykawkę należy wstępnie napełnić roztworem buforowym (w przybliżeniu 100 µl), aby w pełni eluować niewielkie objętości krwi z każdej ryby. Probki krwi pobiera się przez punkcję serca. Na początku rybę należy znieczulić za pomocą MS-222 (100 mg/l). Dzięki podaniu znieczulenia w odpowiedni sposób można rozpoznać bicie serca danio pręgowanego. Podczas nakłuwania serca delikatnie naciskać tłok strzykawki. Zakres objętości krwi do pobrania wynosi 20–40 mikrolitrów. Po nakłuciu serca wypełnić probówkę mieszaniną krwi i roztworu buforowego. Osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie (20 min.; 5 000 g) i należy je przechowywać w temperaturze -80°C do czasu, aż będzie potrzebne do analizy.

Procedura 3C: Standardowa procedura operacyjna: danio pręgowany, homogenizacja głowy i ogona

- 1) Ryby znieczula się i usypia zgodnie z opisem badania.
- 2) Głowę i ogon odcina się od ryby zgodnie z rys. 1.

Uwaga: Przyrządy do przeprowadzania sekcji i deskę do krojenia należy wypłukać i odpowiednio wyczyścić (np. za pomocą 96 % etanolu) przed obróbką każdej ryby w celu uniknięcia przeniesienia »zanieczyszczenia witellogeniną« z samic lub samców, u których VTG występuje, na samce, u których ona nie występuje.

Rysunek 1



- 3) Łączną masę głowy i ogona każdej z ryb mierzy się z dokładnością do pełnego miligrama.
- 4) Po zważeniu tych części umieszcza się je w odpowiednich probówkach (np. probówkach Eppendorfa o pojemności 1,5 ml) i zamraża w temperaturze -80°C do czasu homogenizacji albo bezpośrednio poddaje homogenizacji z lodem za pomocą dwóch tłuczków z tworzywa sztucznego. (Zastosować można również inne metody, pod warunkiem że stosując je, używa się lodu, i można uzyskać jednorodną masę). Uwaga: Probówki należy odpowiednio ponumerować, aby głowa i ogon danej ryby mogły zostać przypisane do odpowiadających im części ciała wykorzystywanych do histologii gonad.
- 5) Po uzyskaniu jednorodnej masy dodaje się 4-krotność wagi tkanki lodowatego roztworu buforowego do homogenizacji (*). Mieszaninę należy dalej rozdrabniać za pomocą tłuczków, dopóki nie stanie się jednorodna. Ważna uwaga: W przypadku każdej ryby wykorzystuje się nowe tłuczki.
- 6) Próbkę umieszcza się z lodem aż do odwirowania w temp. 4°C przy $50\,000 \times g$ przez 30 min.
- 7) Użyć pipety do wprowadzenia porcji supernatantu o objętości 20 μl do co najmniej dwóch probówek przez zanurzenie końcówki pipety pod znajdującą się na wierzchu warstwę tłuszczu i ostrożne zassanie supernatantu bez fragmentów tłuszczu lub grudek.
- 8) Do momentu wykorzystania próbki przechowuje się w temperaturze -80°C .

(*) **Roztwór buforowy do homogenizacji:**

- 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % koktajl inhibitorów proteaz (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl koktajlu inhibitorów proteaz.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), np. firmy Bie & Berntsen, Dania.
- Koktajl inhibitorów proteaz: firmy Sigma (w przypadku tkanki ssaków), numer produktu P 8340.
- Uwaga: Roztwór buforowy do homogenizacji należy wykorzystać w tym samym dniu, w którym został wyprodukowany. Podczas stosowania należy umieścić go w lodzie.

Dodatek 7

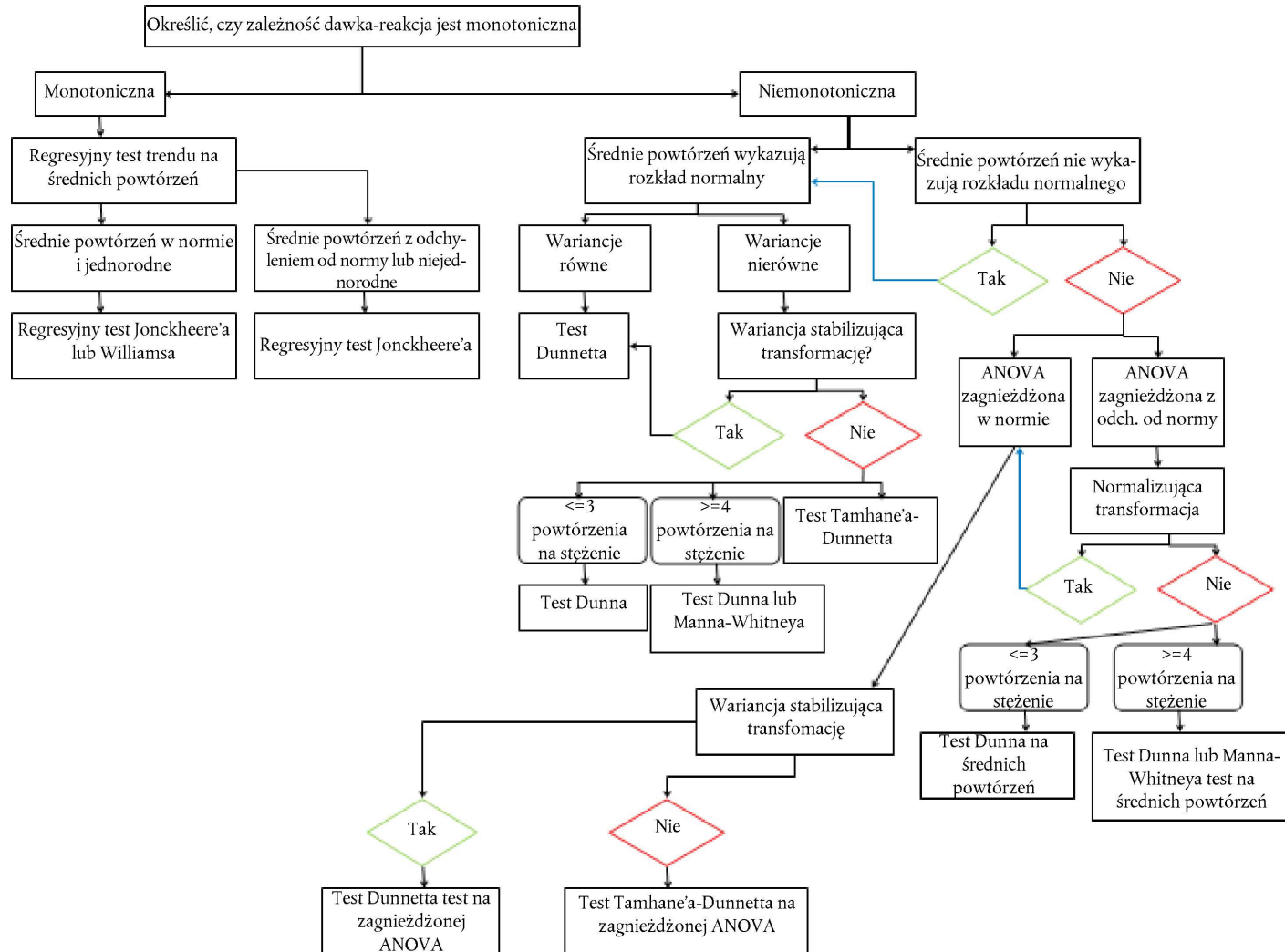
Próbki wzmocnione witellogeniny i międzylaboratoryjny wzorzec referencyjny

Każdego dnia, w którym przeprowadza się badania witellogeniny, zostanie przeanalizowana próbka wzmocniona przygotowana z zastosowaniem międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego. Witellogenina wykorzystana do przygotowania międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego będzie pochodzić z innej partii niż partia wykorzystana do przygotowania wzorców kalibracyjnych w odniesieniu do przeprowadzanego badania.

Próbka wzmocniona zostanie przygotowana przez dodanie znanej ilości międzylaboratoryjnego wzorca do próbki osocza pobranego od samca z próby kontrolnej. Próbka zostanie wzmocniona w celu otrzymania stężenia witellogeniny będącego 10–100-krotnością oczekiwanego stężenia witellogeniny u samców ryb z próby kontrolnej. Próbka osocza pobranego od samca z próby kontrolnej, która zostanie wzmocniona, może pochodzić od pojedynczej ryby albo może składać się z próbek pobranych od kilku ryb.

Podpróbka niewzmocnionego osocza samców z próby kontrolnej zostanie poddana analizie w co najmniej dwóch zduplikowanych studzienkach. Próbka wzmocniona również zostanie poddana analizie w co najmniej dwóch zduplikowanych studzienkach. Średnia ilość witellogeniny w obu niewzmocnionych próbkach osocza pobranych od samców z próby kontrolnej zostanie dodana do obliczonej ilości witellogeniny dodanej do próbek w celu ich wzmocnienia, aby oznaczyć przewidywane stężenie. Stosunek oczekiwanego stężenia do zmierzonego stężenia zostanie odnotowany wraz z wynikami każdego zestawu badań przeprowadzonych w danym dniu.

Schemat decyzyjny do celów analizy statystycznej



C.38. BADANIE PRZEOBRAŻENIA PŁAZÓW**WPROWADZENIE**

1. Opisywana metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 231 (2009 r.) w sprawie badań. Konieczność opracowania i zweryfikowania badania umożliwiającego wykrycie substancji chemicznych oddziałujących na tarczycę kręgowców wynika z obawy, że środowiskowe poziomy substancji chemicznych mogą wywoływać działania niepożądane zarówno u ludzi, jak i w przypadku dzikiej fauny i flory. W 1998 r. OECD zapoczątkowała działania mające na celu przegląd istniejących wytycznych w sprawie badań i opracowanie nowych wytycznych dotyczących przeglądu i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego, nadając tym działaniom wysoki priorytet. Jednym z elementów tych działań było opracowanie wytycznej w sprawie badań dotyczącej przeglądu substancji chemicznych oddziałujących na gruczoł tarczowy kręgowców. Zaproponowano zarówno ulepszenie 28-dniowego badania toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem u gryzoni (rozdział B.7 niniejszego załącznika), jak i badanie przeobrażenia płazów. Ulepszoną metodą badawczą B.7 poddano weryfikacji, a następnie wydano zweryfikowaną metodę badania. Badanie przeobrażenia płazów poddano zakrojonemu na szeroką skalę programowi weryfikacji, który obejmował badania wewnątrzlaboratoryjne i międzylaboratoryjne wykazujące istotność i wiarygodność badania (1, 2). Następnie weryfikacja badania stała się przedmiotem wzajemnej oceny przez zespół niezależnych ekspertów (3). Niniejsza metoda badawcza jest efektem doświadczeń zdobytych podczas badań weryfikacyjnych związanych z wykrywaniem substancji chemicznych oddziałujących na tarczycę i prac prowadzonych w innych państwach będących członkami OECD.

ZASADA BADANIA

2. Badanie przeobrażenia płazów jest badaniem przesiewowym mającym na celu empiryczną identyfikację substancji chemicznych, które mogą zaburzać prawidłowe funkcjonowanie osi podwzgórze–przysadka–tarczyca. Badanie przeobrażenia płazów odpowiada ogólnemu modelowi kręgowców w zakresie, w jakim oparte jest ono na zachowanych strukturach i funkcjach osi podwzgórze–przysadka–tarczyca. Jest to ważne badanie, ponieważ przeobrażenie płazów stanowi dobrze zbadany, zależny od tarczycy proces, będący odpowiedzią na substancje chemiczne aktywne w obrębie osi podwzgórze–przysadka–tarczyca i jest jedynym istniejącym badaniem umożliwiającym wykrycie aktywności tarczycy u zwierzęcia w fazie rozwoju morfologicznego.
3. Zasadniczo plan doświadczalny obejmuje poddanie kijanek *Xenopus laevis* w 51. stadium działania co najmniej trzech prób z różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej i próbie kontrolnej z wodą rozcieńczającą przez 21 dni. Istnieją cztery powtórzenia każdego zabiegu. W momencie rozpoczęcia badania zagęszczenie kijanek w stadium larwalnym wynosi 20 sztuk na zbiornik badawczy w odniesieniu do wszystkich grup poddawanych zabiegom. Punkty końcowe obserwacji obejmują: długość kończyn tylnych, długość mierzona od otworu gębowego do odbytu, stadium rozwojowe, mokra masa, histologia tarczycy i dzienne obserwacje śmiertelności.

OPIS METODY**Badany gatunek**

4. Gatunek *Xenopus laevis* hoduje się rutynowo w laboratoriach na całym świecie i jest on łatwo dostępny za pośrednictwem dostawców komercyjnych. Ten gatunek można łatwo skłonić do rozmnażania przez cały rok, stosując zastrzyki z ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG), a uzyskane w ten sposób larwy można hodować w dużej liczbie aż do osiągnięcia wybranego stadium rozwoju, aby umożliwić wykorzystanie protokołów badań dotyczących konkretnego stadium. Zaleca się, aby larwy użyte do badania pochodziły od własnych dorosłych osobników. Inną możliwość, chociaż nie jest to preferowana procedura, stanowi przewieszenie komórek jajowych lub zarodków do laboratorium przeprowadzającego badanie i następnie poddanie ich aklimatyzacji; wysyłanie stadiów larwalnych do wykorzystania w badaniu jest niedopuszczalne.

Sprzęt i materiały

5. W celu wykonania niniejszego badania wymagane jest zastosowanie następującego sprzętu i materiałów:
 - a) układu narażenia (zob. opis poniżej);
 - b) akwariów wykonanych ze szkła lub stali nierdzewnej (zob. opis poniżej);
 - c) zbiorników reprodukcyjnych;
 - d) aparatury do regulacji temperatury (np. urządzeń do ogrzewania lub chłodzenia (ustawionych na temperaturę 22 ± 1 °C));

- e) termometru;
- f) dwuokularowego mikroskopu preparacyjnego;
- g) aparat cyfrowego o rozdzielczości co najmniej 4 megapikseli i z funkcją mikro;
- h) oprogramowania do cyfrowej obróbki obrazu;
- i) płytek Petriego (np. 100 × 15 mm) lub przezroczystej komory porównywalnej wielkości z tworzywa sztucznego;
- j) wagi analitycznej umożliwiającej pomiar z dokładnością do trzeciego miejsca po przecinku (mg);
- k) miernika rozpuszczonego tlenu;
- l) pehametru;
- m) miernika natężenia światła umożliwiającego pomiar w luksach;
- n) różnych laboratoryjnych naczyń szklanych i narzędzi;
- o) regulowanych pipet (10–5 000 µl) lub różnych pipet o równoważnych pojemnościach;
- p) badanej substancji chemicznej w ilościach wystarczających do wykonania badania, najlepiej z jednej partii;
- q) instrumentów analitycznych odpowiednich dla badanej substancji chemicznej lub zakontraktowanych usług analitycznych.

Testowalność chemiczna

6. Badanie przeobrażenia płazów jest oparte na protokole narażenia w środowisku wodnym, zgodnie z którym badana substancja chemiczna jest wprowadzana do komór badawczych za pośrednictwem układu przepływowego. Metody przepływowe mają jednak ograniczenia dotyczące rodzaju substancji chemicznej, która może być badana, wynikające z jej właściwości fizykochemicznych. W związku z tym przed zastosowaniem tego protokołu należy uzyskać podstawowe informacje na temat danej substancji chemicznej, istotne dla określania jej testowalności, oraz należy sprawdzić informacje podane w wytycznej OECD dotyczącej badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (*Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*) (4). Właściwości wskazujące, że badanie danej substancji chemicznej w środowisku wodnym może być utrudnione: wysoki współczynnik podziału oktanol/woda ($\log K_{ow}$), duża lotność, podatność na hydrolizę i podatność na fotolizę w warunkach oświetlenia, które występują w laboratorium. Inne czynniki również mogą mieć znaczenie przy określaniu testowalności i należy je ustalić indywidualnie dla każdego przypadku. Jeżeli w przypadku danej substancji chemicznej nie można przeprowadzić badania z wykorzystaniem przepływowego układu badawczego, można wykorzystać układ wymiany statycznej. Jeżeli żaden z układów nie nadaje się do wprowadzania badanej substancji chemicznej, wówczas standardowo nie bada się jej na podstawie tego protokołu.

Układ narażenia

7. W miarę możliwości preferowany jest układ przepływowy z wykorzystaniem rozcieńczalnika zamiast układu wymiany statycznej. Jeżeli właściwości fizyczne lub chemiczne którejkolwiek z badanych substancji chemicznych nie pozwalają wprowadzić jej do układu przepływowego z rozcieńczalnikiem, wówczas można zastosować alternatywny układ narażenia (np. wymianę statyczną). Części składowe układu, które mają kontakt z wodą, powinny być wykonane ze szkła, stali nierdzewnej lub politetrafluoroetyleny. Można jednak zastosować odpowiednie tworzywa sztuczne, o ile nie wpływa to na protokół badania. Jako zbiorniki do badań narażenia należy stosować akwaria wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej i wyposażone w syfony, o objętości od około 4,0 do 10,0 l i minimalnej głębokości wody 10–15 cm. Układ powinien umożliwiać utrzymanie wszystkich stężeń ekspozycyjnych i próby kontrolnej z czterema kontrpróbami na każdy zabieg. Natężenie przepływu do każdego zbiornika powinno być stałe zarówno względu na utrzymanie warunków biologicznych, jak i narażenia chemicznego (np. 25 ml/min.). Zbiorniki do zabiegów narażenia należy losowo umieścić w układzie narażenia w celu ograniczenia ewentualnych skutków wynikających z ich umiejscowienia, między innymi niewielkich różnic temperatury, natężenia światła itd. Należy zastosować światło fluorescencyjne, aby zapewnić fotoperiod wynoszący 12 godzin światła i 12 godzin ciemności, o natężeniu wynoszącym 600–2 000 luksów (lumenów/m²) na powierzchni wody. W każdym zbiorniku testowym temperatura wody powinna być utrzymana na poziomie 22 ± 1 °C, pH utrzymane w przedziale 6,5–8,5, a stężenie rozpuszczonego tlenu $> 3,5$ mg/l (> 40 % nasycenia powietrzem). Minimalną temperaturę wody, pH i rozpuszczony tlen należy mierzyć raz w tygodniu, jednak w co najmniej jednym naczyniu badawczym temperaturę należy monitorować w sposób ciągły. W dodatku 1 przedstawione zostały warunki doświadczalne, w jakich należy stosować protokół. W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących skompilowania przepływowych układów ekspozycji lub układów wymiany statycznej należy zapoznać się z opracowanymi przez ASTM wytycznymi dotyczącymi przeprowadzania badań toksyczności ostrej na materiale badawczym przy użyciu ryb, dużych bezkręgowców i płazów (*Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*) (5) oraz ogólnymi badaniami toksyczności w środowisku wodnym.

Jakość wody

8. Można użyć każdej wody, która jest dostępna w danym miejscu (np. woda źródłana lub woda wodociągowa przefiltrowana przez filtr węglowy) i która umożliwia normalny wzrost i rozwój kijanek *X. laevis*. Ponieważ jakość lokalnie dostępnej wody może znacząco różnić się w zależności od obszaru, należy wykonać analizy jakości wody, w szczególności jeżeli nie są dostępne historyczne dane dotyczące przydatności wody do hodowli *Xenopus*. Szczególną uwagę należy zwrócić na to, aby woda nie zawierała miedzi, chloru i chloramin, ponieważ wszystkie te substancje są toksyczne dla żab i kijanek. Zaleca się również zbadanie wody pod kątem poziomów tła fluorku, nadchloranu i chloranu (produktów ubocznych dezynfekcji wody pitnej), ponieważ wszystkie te aniony są substratami dla transportera jodu tarczycy i podwyższony poziom któregośkolwiek z nich może zakłócić wynik badania. Analiza powinna zostać wykonana przed rozpoczęciem badania, a woda użyta do badania powinna zazwyczaj być pozbawiona tych anionów.

Stężenie jodu w badanej wodzie

9. Aby tarczycy mogła syntezować hormony tarczycy, larwy muszą mieć dostęp do wystarczającej ilości związków jodu dostarczonych za pośrednictwem wody lub pożywienia. Obecnie nie istnieją żadne określone empirycznie wytyczne dotyczące minimalnego stężenia jodu. Obecność jodu może jednak wpływać na zdolność reagowania tarczycy na substancje aktywne oddziałujące na gruczoł tarczowy i wiadomo, że jod moduluje podstawową aktywność tarczycy – aspekt, który należy uwzględnić, interpretując wyniki histopatologii tarczycy. W sprawozdaniu należy podać stężenia jodu w wodzie do badania. Na podstawie dostępnych danych z badania weryfikacyjnego wykazano, że protokół funkcjonuje odpowiednio, jeżeli stężenia jodu (I) w wodzie do badania mieszczą się w przedziale 0,5–10 µg/l. Najlepiej byłoby, gdyby minimalne stężenie jodu w wodzie do badania wynosiło 0,5 µg/l. Jeżeli do badania stosowana jest woda regenerowana odtworzona z wody dejonizowanej, należy dodać jod w minimalnym stężeniu wynoszącym 0,5 µg/l. W sprawozdaniu należy uwzględnić każde dodatkowe uzupełnienie wody do badania jodem lub innymi solami.

Trzymanie zwierząt*Opieka na osobnikami dorosłymi i hodowla*

10. Opieka nad osobnikami dorosłymi i hodowla przebiegają zgodnie ze standardowymi wytycznymi, a w celu uzyskania bardziej szczegółowych informacji należy zapoznać się ze standardowymi wytycznymi dotyczącymi badania teratogenezy w zarodkach żab (*Frog Embryo Teratogenesis Assay (FETAX)*) (6). Takie standardowe wytyczne zawierają przykład odpowiednich metod opieki i hodowli, ale ich ścisłe ich przestrzeganie nie jest konieczne. W celu nakłonienia zwierząt do rozmnażania się parom (3–5) dorosłych samic i samców wstrzykuje się ludzką gonadotropinę kosmówkową (hCG). Żeńskim i męskim osobnikom wstrzykuje się, odpowiednio, 800–1 000 IU i 600–800 IU hCG rozpuszczonego w 0,6–0,9 % roztworze soli fizjologicznej. Pary hodowlane trzymane są w dużych zbiornikach zapewniających spokój i niezmiennie warunki dla przyjęcia pozycji amplexusu. Dno każdego akwarium reprodukcyjnego powinno posiadać fałszywe dno wykonane z nierdzewnej stali lub siatki z tworzywa sztucznego, które umożliwia opadanie pakietów jaj na dno zbiornika. Żaby, które otrzymały zastrzyk późnym popołudniem, zazwyczaj złożą większość skrzeku późnym rankiem następnego dnia. Po złożeniu i zapłodnieniu wystarczającej liczby komórek jajowych dorosłe osobniki powinny zostać usunięte z akwariów reprodukcyjnych.

Opieka nad larwami i selekcja

11. Po usunięciu dorosłych osobników z akwarium reprodukcyjnego komórki jajowe zbiera się i ocenia pod kątem ich żywotności, wykorzystując w tym celu reprezentatywną próbkę zarodków ze wszystkich akwariów reprodukcyjnych. Należy zachować najlepszy skrzek (zaleca się 2–3 pakiety w celu oceny jakości skrzeku) na podstawie żywotności zarodków i ich odpowiedniej liczby (minimum 1 500). Wszystkie organizmy wykorzystane w badaniu powinny pochodzić z jednego okresu godowego (tj. nie należy mieszać skrzeków z różnych okresów). Zarodki należy umieścić na dużej, płaskiej szalce lub płytce i za pomocą pipety lub zakraplacza usunąć wszystkie jaja, które są ewidentnie martwe lub wykazują nieprawidłowości (zob. definicja w (5)). Zdrowe zarodki z każdego z trzech pakietów skrzeku przenosi się do trzech oddzielnych zbiorników wylęgowych. Po czterech dniach od umieszczenia jaj w zbiornikach wylęgowych wybiera się najlepszy skrzek pod względem żywotności i skutecznego wylęgu i przenosi się larwy do odpowiedniej liczby zbiorników hodowlanych o temperaturze 22 ± 1 °C. Ponadto pewną liczbę dodatkowych larw przenosi się do dodatkowych zbiorników w celu zastąpienia larw w razie wystąpienia upadków w zbiornikach hodowlanych w pierwszym tygodniu. Procedura ta pozwala zachować stałe zagęszczenie organizmów i przez to ograniczyć rozbieżności rozwojowe w kohorcie pochodzącej z jednego skrzeku. Wszystkie zbiorniki hodowlane należy codziennie opróżniać do czysta przez syfon. Jako środek ostrożności zaleca się stosowanie rękawic winylowych lub nitylowych zamiast rękawic lateksowych. Padnięte zwierzęta należy usuwać codziennie i dodawać larwy zastępcze w celu utrzymania zagęszczenia organizmów podczas pierwszego tygodnia. Karmienie powinno mieć miejsce co najmniej dwa razy dziennie.

12. Na etapie poprzedzającym narażenie kijanki są aklimatyzowane do warunków właściwego etapu narażenia, w tym do rodzaju pokarmu, temperatury, cyklu światła/ciemności i pożywki hodowlanej. W związku z tym zaleca się, aby na etapie poprzedzającym narażenie i etapie narażenia była wykorzystywana ta sama woda do hodowli/woda rozcieńczająca. Jeżeli stosowany jest statyczny system hodowli kijanek na etapie poprzedzającym narażenie, pożywkę hodowlaną należy całkowicie wymieniać co najmniej dwa razy w tygodniu. Należy unikać zatłoczenia spowodowanego nadmierną liczebnością larw w trakcie etapu poprzedzającego narażenie, ponieważ może to znacznie wpłynąć na rozwój kijanek na kolejnych etapach badania. W związku z tym zagęszczenie hodowli nie powinno przekraczać w przybliżeniu czterech kijanek na jedną pożywkę hodowlaną (układ statycznego narażenia) lub 10 kijanek na jedną pożywkę hodowlaną (np. przy natężeniu przepływu wynoszącym 50 ml/min. w układzie poprzedzającym narażenie lub układzie hodowlanym). W takich warunkach kijanki powinny w ciągu dwunastu dni rozwinąć się ze stadium 45/46 do stadium 51. Kijanki reprezentatywne dla tej populacji wyjściowej należy codziennie kontrolować pod względem stadium rozwojowego w celu oszacowania odpowiedniego momentu do rozpoczęcia narażenia. Należy dbać, aby ograniczyć do minimum stres i traumę, na jakie narażone są kijanki, w szczególności podczas poruszania, czyszczenia akwariów i przenoszenia larw. Należy unikać stresujących warunków/działań, takich jak głośny lub nieustanny hałas, stukanie palcem w akwarium, drgania w akwariach, nadmierna aktywność w laboratorium i nagłe zmiany warunków środowiskowych (dostępności światła, temperatury, pH, stężenie rozpuszczonego tlenu, wartości natężenia przepływów itd.). Jeżeli kijanki nie osiągną 51. stadium w ciągu 17 dni po zapłodnieniu, za potencjalną przyczynę należy uznać nadmierny stres.

Hodowla i karmienie larw

13. Kijanki karmi się dostępnym w handlu pokarmem dla kijanek wykorzystywanym podczas badania weryfikacyjnego (zob. również dodatek 1) w okresie poprzedzającym narażenie (za Nieuwkoopem i Faberem (NF) 45/46. stadium (8)) i w trakcie całego okresu trwania badania wynoszącego 21 dni lub stosuje się inną dietę, która wykazywała takie samo działanie w badaniu przeobrażenia płazów. Schemat żywienia w okresie poprzedzającym narażenie należy dokładnie dostosować do potrzeb rozwijających się kijanek. Oznacza to, że nowo wyklutym kijankom należy dostarczać małe porcje pokarmu kilka razy dziennie (co najmniej dwa). Należy unikać podawania nadmiaru pokarmu, aby i) zachować jakość wody oraz ii) aby zapobiec zatkanie filtrów skrzelowych cząsteczkami pokarmu i drobnej materii organicznej. W przypadku pokarmu dla kijanek stosowanego w badaniach weryfikacyjnych codzienne dawki pokarmu należy zwiększać w miarę wzrostu kijanki do około 30 mg na zwierzę na dobę tuż przed rozpoczęciem badania. Badania weryfikacyjne wykazały, że dostępny w handlu pokarm wspomaga właściwy wzrost i rozwój kijanek gatunku *X. laevis*, a dzięki dużemu rozdrobnieniu jego cząstki pozostają zawieszone w wodzie na długi okres i są wypłukiwane przez przepływającą wodę. W związku z tym całkowitą dzienną ilość pokarmu należy podzielić na mniejsze porcje i podawać co najmniej dwa razy dziennie. W przypadku takiego pokarmu schemat żywienia został przedstawiony w tabeli 1. Należy rejestrować porcje pokarmu. Pokarm może być podawany na sucho lub jako roztwór podstawowy przygotowany w wodzie rozcieńczającej. Roztwór podstawowy tego rodzaju należy sporządzać na nowo co drugi dzień i przechowywać w temperaturze do 4 °C, gdy nie jest używany.

Tabela 1.

Schemat żywienia dostępnym w handlu pokarmem dla kijanek zastosowany podczas badań weryfikacyjnych w odniesieniu do kijanek *X. laevis* w trakcie rozwojowej części badania przeobrażenia płazów w warunkach przepływu

Dzień badania	Dawka pokarmu (mg pokarmu/zwierzę/dobę)
0-4.	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Chemia analityczna

14. Przed przystąpieniem do badania należy ocenić stabilność badanej substancji chemicznej, wykorzystując w tym celu istniejące informacje dotyczące jej rozpuszczalności, podatności na rozkład i lotności. Z każdego zbiornika z kontrpróbą należy pobrać do analiz chemicznych co najmniej cztery próbki roztworów do badań w każdym stężeniu w momencie rozpoczęcia badania (dzień 0) i co tydzień w trakcie trwania badania. Zaleca się również analizę każdego badanego stężenia podczas przygotowywania układu przed rozpoczęciem badania w celu zweryfikowania efektywności układu. Ponadto zaleca się analizę roztworów podstawowych podczas ich wymiany, w szczególności jeżeli objętość roztworu podstawowego nie zapewnia odpowiednich ilości substancji chemicznej na cały czas trwania okresów rutynowego pobierania próbek. W przypadku substancji chemicznych, których nie można wykryć na pewnym poziomie stężenia lub na poziomie wszystkich stężeń wykorzystanych w badaniu, należy dokonać pomiaru roztworów podstawowych i odnotować natężenie przepływu w układzie w celu obliczenia stężeń nominalnych.

Dostarczanie substancji chemicznej

15. Metoda wprowadzania badanej substancji chemicznej do układu może różnić się w zależności od właściwości fizykochemicznych substancji. Substancje chemiczne rozpuszczalne w wodzie można rozpuszczać w podwielokrotnych częściach wody do badania w stężeniu, które pozwoli na wprowadzenie tych substancji w docelowym stężeniu badanym do układu przepływowego. Substancje chemiczne, które są płynne w temperaturze pokojowej i słabo rozpuszczalne w wodzie, można wprowadzać, wykorzystując do tego celu metody saturatora ciecz-ciecz. Substancje chemiczne stałe w temperaturze pokojowej i słabo rozpuszczalne w wodzie mogą zostać wprowadzone za pomocą saturatorów z kolumną wypełnioną watą szklaną (7). Zaleca się zastosowanie układu badawczego bez nośnika, jednak różne badane substancje chemiczne będą posiadały różne właściwości fizykochemiczne, które będą prawdopodobnie wymagały różnego podejścia do przygotowania wody służącej do narażenia na działanie substancji chemicznej. Zaleca się unikać stosowania rozpuszczalników lub nośników, ponieważ: i) niektóre rozpuszczalniki same mogą powodować toksyczność lub niepożądane albo nieoczekiwane reakcje endokrynologiczne, ii) badanie substancji chemicznych, których rozpuszczalność w wodzie zostaje przekroczona (co często ma miejsce w wyniku stosowania rozpuszczalników), może skutkować niedokładnym określeniem efektywnych stężeń oraz iii) stosowanie rozpuszczalników w przypadku badań długoterminowych może skutkować znacznym rozrostem biofilmu związanym z aktywnością mikroorganizmów. W przypadku substancji chemicznych, których badanie nastręcza trudności, rozpuszczalnik można zastosować tylko w ostateczności, a w celu wyboru najlepszej metody należy zapoznać się z wytyczną OECD dotyczącą badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (*Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (4). Wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany chemicznymi właściwościami substancji chemicznej. Do rozpuszczalników, które okazały się skuteczne w przypadku badań toksyczności w środowisku wodnym, zalicza się aceton, etanol, metanol, dimetyloformamid i glikol trójetylenowy. W przypadku wykorzystania rozpuszczalnika jako nośnika stężenie rozpuszczalnika powinno być niższe niż chroniczne stężenie NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian); w wytycznej OECD zaleca się maksymalne stężenie 100 µl/l, a zgodnie z ostatnim przeglądem zaleca się stosowanie stężenia rozpuszczalnika wynoszącego zaledwie 20 µl/l wody rozcieńczającej (12). Jeżeli zastosowane zostaną nośniki rozpuszczalnikowe, oprócz prób kontrolnych bez rozpuszczalnika (czysta woda) należy również ocenić odpowiednie próby kontrolne z rozpuszczalnikiem. Jeżeli nie możliwe jest podanie substancji chemicznej z wodą ze względu na jej właściwości fizykochemiczne (niska rozpuszczalność) albo ograniczoną dostępność chemiczną, można rozważyć jej wprowadzanie z pokarmem. Przeprowadzono wstępne prace nad narażeniem z pokarmem, jednak ta droga narażenia nie jest powszechnie stosowana. Wybór metody należy udokumentować i zweryfikować w sposób analityczny.

Dobór badanych stężeń

Ustalenie wysokiego stężenia badanego

16. Do celów niniejszego badania wysokie stężenie badane odpowiada granicy rozpuszczalności badanej substancji chemicznej; maksymalnemu tolerowanemu stężeniem (MTC) w przypadku substancji chemicznych o dużej toksyczności; albo 100 mg/l, w zależności od tego, która z tych wartości jest niższa.
17. MTC jest definiowane jako najwyższe badane stężenie substancji chemicznej, którego skutkiem jest mniej niż 10 % przypadków śmiertelności ostrej. Przy zastosowaniu tego podejścia zakłada się istnienie empirycznych danych dotyczących śmiertelności ostrej, na podstawie których oszacować można MTC. Oszacowanie MTC może być niedokładne i zazwyczaj wymaga odwołania się do swojej najlepszej wiedzy. Choć wykorzystanie modeli regresji jest najodpowiedniejszym pod względem technicznym podejściem do oszacowania MTC, przydatne przybliżenie MTC można uzyskać na podstawie istniejących danych dotyczących przypadków śmiertelności ostrej dzięki zastosowaniu 1/3 wartości LC₅₀. Dane dotyczące toksyczności ostrej dla badanych gatunków mogą jednak być niedostępne. Jeżeli niedostępne są dane dotyczące toksyczności ostrej charakterystyczne dla danego gatunku, można wówczas przeprowadzić 96-godzinne badanie LC₅₀ na kijankach reprezentatywnych (tj. w tym samym stadium) dla kijanek uczestniczących w badaniu przeobrażenia płazów. Jeżeli dostępne są dane dotyczące innych gatunków wodnych (np. badania LC₅₀ dla ryb lub innych gatunków płazów), można odwołać się do swojej najlepszej wiedzy w celu oszacowania prawdopodobnego MTC na podstawie międzygatunkowej ekstrapolacji.

18. W przypadkach, gdy substancja chemiczna nie charakteryzuje się toksycznością ostrą i jej rozpuszczalność wynosi powyżej 100 mg/l, za najwyższe badane stężenie należy uznać 100 mg/l, ponieważ takie stężenie uznaje się zazwyczaj za »praktycznie nietoksyczne«.
19. W przypadku gdy metody przepływowe nie pozwalają uzyskać MTC, można zastosować metody wymiany statycznej, chociaż nie jest to zalecana procedura. Jeżeli zastosowane zostały metody wymiany statycznej, wówczas należy udokumentować stabilność stężenia badanej substancji chemicznej, które nie powinna przekraczać limitów kryteriów efektywności. Zaleca się, aby okresy wymiany wynosiły dwadzieścia cztery godziny. Okresy wymiany nie mogą przekraczać 72 godzin. Ponadto parametry jakości wody (np. DO, temperatura, pH itd.) należy mierzyć pod koniec każdego okresu wymiany bezpośrednio przed wymianą.

Zakres badanych stężeń

20. Wymagane jest zastosowanie *minimum* trzech badanych stężeń i próby z czystą wodą (oraz, jeżeli jest to konieczne, grupy kontrolnej nośnika). Minimalna różnica badanych stężeń pomiędzy najwyższym a najniższym stężeniem powinna wynosić mniej więcej jeden rząd wielkości. Maksymalna wartość między dawkami wynosi 0,1, a minimalna – 0,33.

PROCEDURA:

Rozpoczęcie i przeprowadzenie badania

Dzień 0

21. Narażanie należy rozpocząć w momencie, gdy wystarczająca liczba kijanek podstawowej populacji przed narażeniem osiągnęła 51. stadium rozwojowe zgodnie z kryteriami Nieuwkoopa i Fabera (8), co oznacza wiek nie przekraczający 17 po zapłodnieniu. W celu wyboru zwierząt, które zostaną użyte do badania, zdrowe i normalnie wyglądające kijanki z podstawowej populacji należy umieścić razem w pojedynczym naczyniu zawierającym odpowiednią ilość wody rozcieńczającej. Aby określić stadium rozwoju, kijanki należy pojedynczo wyjmować ze wspólnego zbiornika za pomocą małej siatki lub sitka i przenosić do przezroczystej komory pomiarowej (np. na płytkę Petriego o wymiarach 100 mm) zawierającej wodę rozcieńczającą. W celu określenia stadium rozwoju zaleca się, aby nie stosować znieczulenia, chociaż przed przeniesieniem można znieczulić poszczególne kijanki stosując 100 mg/l metanosulfonioanu trikainy (np. MS-222) odpowiednio zbuforowanego wodorowęglanem sodu (pH 7,0). W przypadku zastosowania tego sposobu metodę dotyczącą odpowiedniego użycia np. MS-222 do znieczulenia należy otrzymać od doświadczonych laboratoriów i podać wraz z wynikami badań. Należy ostrożnie obchodzić się ze zwierzętami podczas przenoszenia, aby zminimalizować wynikający z tego stres i nie dopuścić do zranienia.
22. Stadium rozwojowe zwierząt określa się, stosując dwuokularowy mikroskop preparacyjny. W celu zminimalizowania zasadniczej zmienności w odniesieniu do stadium rozwojowego ważne jest, aby etap ten został przeprowadzony w jak najdokładniejszy sposób. Według Nieuwkoopa i Fabera (8) pierwotnym wyznacznikiem rozwoju decydującym o określeniu 51. stadium rozwojowego organizmów jest morfologia kończyny tylnej. Morfologiczne właściwości kończyn tylnych należy zbadać pod mikroskopem. Chociaż w celu uzyskania wyczerpujących informacji dotyczących oceny stadium kijanek należy zapoznać się z całym przewodnikiem Nieuwkoopa i Fabera (8), stadium można w wiarygodny sposób ocenić, wykorzystując wyraźnie widoczne morfologiczne cechy charakterystyczne. Poniższa tabela może zostać wykorzystana do uproszczenia i standaryzacji procesu oceny stadium dzięki określeniu tych wyraźnie widocznych morfologicznych cech charakterystycznych związanych z różnymi stadiami, przy założeniu, że rozwój przebiega prawidłowo.

Tabela 2.

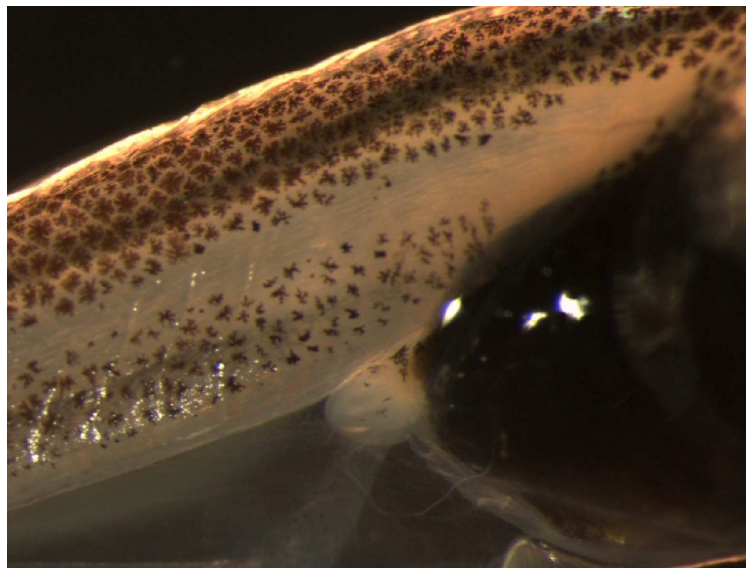
Wyraźnie widoczne morfologiczne cechy charakterystyczne wyznaczające stadium rozwoju na podstawie wskazówek Nieuwkoopa i Fabera.

Wyraźnie widoczne morfologiczne cechy charakterystyczne	Stadium rozwojowe															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Kończyna tylna	X	X	X	X	X	X	X									
Kończyna przednia						X	X	X	X	X						
Struktura twarzoczaszki										X	X	X	X			
Morfologia nerwu węchowego											X	X	X			
Długość ogona													X	X	X	X

23. W momencie rozpoczęcia badania wszystkie kijanki powinny znajdować się 51. stadium rozwoju. Najbardziej widoczną morfologicznie cechą charakterystyczną określającą stadium jest w przypadku tego stadium morfologia kończyny tylnej, która została pokazana na rys. 1.

Rysunek 1.

Morfologia kończyny tylnej kijanki *X. laevis* w 51. stadium.



24. Oprócz wyboru na podstawie stadium rozwojowego zastosować można opcjonalnie wybór na podstawie wielkości zwierząt użytych do badania. W tym celu w dniu 0 należy zmierzyć długość całego ciała (nie długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu) dla podpróby około 20 kijanek w 51. stadium według Nieuwkoop i Fabera. Po obliczeniu średniej długości całego ciała dla tej grupy zwierząt można określić minimalną i maksymalną graniczną wartość długości całego ciała zwierząt użytych do badania, dopuszczając średnią wartość ± 3 mm (średnie wartości długości całego ciała dla kijanek w 51. stadium mieszczą się w przedziale między 24,0 i 28,1 mm). Stadium rozwojowe stanowi jednak zasadniczy parametr przy określaniu gotowości każdego z badanych zwierząt. Z badania wykluczyć należy kijanki z wyraźnie widocznymi wadami rozwojowymi lub urazami.
25. Kijanki spełniające opisane powyżej kryteria stadium rozwojowego przechowywane są w zbiorniku hodowlanym z czystą wodą do czasu ukończenia procesu oceny stadium. Po zakończeniu oceny stadium larwy losowo rozmieszcza się w zbiornikach zabiegowych, tak aby w każdym zbiorniku znalazło się 20 larw. Każdy ze zbiorników zabiegowych sprawdza się następnie pod kątem zwierząt o nietypowym wyglądzie (np. urazy, nietypowe zachowanie podczas pływania itd.). Kijanki mające wyraźnie niezdrowy wygląd należy usunąć ze zbiorników zabiegowych i zastąpić nowo wybranymi larwami ze wspólnego zbiornika.

Uwagi

26. W celu uzyskania bardziej szczegółowych informacji dotyczących procedur zakończenia badania i postępowania z kijankami należy zapoznać się z wytyczną OECD dotyczącą histologii tarczycy płazów (*Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology*) (9).

Dzień 7 Pomiar

27. W 7. dniu z każdego zbiornika badawczego usuwa się pięć losowo wybranych kijanek na każdą kontrpróbę. Wykorzystanie losowej procedury powinno zapewnić każdemu organizmowi użytemu do badania takie samo prawdopodobieństwo zostania wybranym. Można to osiągnąć, wykorzystując dowolną metodę randomizacji, ale konieczne jest złapanie każdej kijanki. Niewybrane kijanki wracają do zbiornika, z którego pochodzą, a wybrane kijanki zostają w humanitarny sposób uśmiercone za pomocą 150–200 mg/l np. MS-222 odpowiednio zbuforowanego wodorowęglanem sodu do uzyskania pH 7,0. Uśmiercone kijanki opłukuje się w wodzie i osusza na bibule, a następnie określa się ich masę ciała z dokładnością do pełnego miligrama. W odniesieniu do każdej kijanki określa się długość kończyn tylnych, długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu i stadium rozwojowe (wykorzystując dwuokularowy mikroskop preparacyjny).

21. dzień – Pomiary (Zakończenie badania)

28. W dniu zakończenia badania (21. dzień) pozostałe kijanki usuwa się ze zbiorników badawczych i w humanitarny sposób uśmierca, jak powyżej, za pomocą 150–200 mg/l np. MS-222 odpowiednio zbuforowanego wodorowęglanem sodu. Kijanki płucze się w wodzie i osusza na bibule, a następnie określa się ich masę ciała z dokładnością do pełnego miligrama. W odniesieniu do każdej kijanki określa się jej stadium rozwojowe, długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu i długość kończyn tylnych.
29. Wszystkie larwy umieszcza się w utrwalaczu Davidsona na 48–72 godzin albo jako próbki w postaci całego ciała albo jako próbki w postaci wyciętego fragmentu tkanki głowy zawierającego dolną szczękę do oceny histologicznej. Do celów histopatologicznych należy pobrać próbki od ogółem pięciu kijanek z każdego zbiornika z kontrpróbą. Ponieważ wysokość komórek folikularnych jest zależna od stadium (10), najodpowiedniejszym podejściem do pobierania próbek do analizy histologicznej jest wykorzystanie, o ile to możliwe, osobników dopasowane pod względem stadium. W celu wyboru osobników dopasowanych pod względem stadium wszystkie larwy muszą najpierw zostać ocenione pod kątem stadium rozwojowego przed wyborem i późniejszym przetwarzaniem na potrzeby gromadzenia danych i utrwalania. Jest to konieczne, ponieważ normalna rozbieżność w rozwoju spowoduje zróżnicowany rozkład stadiów w każdym zbiorniku z kontrpróbą.
30. Zwierzęta wybrane do badań histopatologicznych ($n = 5$ z każdej kontrpróby) powinny, w miarę możliwości, odpowiadać medianie stadium prób kontrolnych (połączone kontrpróby). W przypadku zbiorników z kontrpróbą, w których znajduje się więcej niż pięć larw w odpowiednim stadium, należy wybrać losowo pięć larw.
31. W przypadku zbiorników z kontrpróbą, w których znajduje się mniej niż pięć larw w odpowiednim stadium, należy losowo wybrać osobniki znajdujące się w bezpośrednio niższym lub wyższym stadium rozwoju w celu uzyskania całkowitej wielkości próby wynoszącej pięć larw na kontrpróbę. Decyzję o wybraniu dodatkowych larw z albo bezpośrednio niższego, albo bezpośrednio wyższego stadium rozwoju zaleca się podjąć na podstawie ogólnej oceny rozkładu stadiów w próbie kontrolnej i w grupie poddanej zabiegom chemicznym. Oznacza to, że jeżeli zabieg chemiczny związany jest z opóźnieniem rozwoju, należy wybrać dodatkowe larwy z bezpośrednio niższego stadium rozwoju. Jeżeli z kolei zabieg chemiczny związany jest z przyspieszeniem rozwoju, wtedy należy wybrać dodatkowe larwy z bezpośrednio wyższego stadium.
32. W przypadkach znacznych zmian w rozwoju kijanek spowodowanych zabiegami z badaną substancją chemiczną rozkład stadiów w grupie poddanej działaniu badanej substancji chemicznej może nie pokrywać się z obliczoną medianą stadium rozwojowego w próbie kontrolnej. Tylko w takich przypadkach należy zmodyfikować proces wyboru poprzez wykorzystanie stadium innego niż mediana stadium próby kontrolnej w celu uzyskania próby larw dopasowanych pod względem stadium na potrzeby histopatologii tarczycy. Ponadto jeżeli stadia są nieokreślone (tj. asynchroniczne), do analizy histologicznej należy losowo wybrać 5 kijanek z każdej kontrpróby. Należy podać przesłanki leżące u podstaw wyboru każdej larwy, której stadium nie odpowiada medianie stadium rozwojowego w próbie kontrolnej.

Określenie biologicznych punktów końcowych

33. W takcie trwającego 21 dni etapu narażenia pomiar pierwszorzędowych punktów końcowych wykonuje się w 7. i 21. dniu, konieczna jest jednak codzienna obserwacja zwierząt użytych do badania. Tabela 3 przedstawia przegląd punktów końcowych objętych pomiarami i odpowiadające im punkty czasowe obserwacji. Bardziej szczegółowe informacje dotyczące technicznych procedur pomiaru szczytowych punktów końcowych i ocen histologicznych można znaleźć w wytycznych OCED (9).

Tabela 3.

Punkty czasowe obserwacji dla pierwotnych punktów końcowych w badaniu przeobrażenia płazów

Szczytowe punkty końcowe	Codziennie	Dzień 7	Dzień 21
— Śmiertelność	•		
— Stadium rozwojowe		•	•
— Długość kończyn tylnych		•	•
— Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu		•	•
— Mokra masa ciała		•	•
— Histologia tarczycy			•

Szczytowe punkty końcowe

34. Stadium rozwojowe, długość kończyn tylnych, długość mierzona od otworu gębowego do odbytu oraz masa mokra to szczytowe punkty końcowe w badaniu przeobrażenia płazów, z których każdy opisano pokrótce poniżej. Dodatkowe informacje techniczne dotyczące gromadzenia tych danych są dostępne w wytycznych, o których mowa w bibliografii, obejmujących procedury wspomaganej komputerowo analizy, którą zaleca się stosować.

Stadium rozwojowe

35. Stadium rozwojowe kijanek *X. laevis* określa się, stosując kryteria oceny stadiów Nieuwkoop i Fabera (8). Dane dotyczące stadium rozwojowego wykorzystuje się w celu określenia, czy rozwój jest przyspieszony, asynchroniczny, opóźniony, czy też nie ulega zmianie. Przyspieszenie lub opóźnienie rozwoju jest określane przez porównanie mediany stadium w próbie kontrolnej i w grupach poddawanych badaniu. Rozwój asynchroniczny występuje wówczas, gdy badane tkanki nie mają wad rozwojowych lub nie są nieprawidłowe, ale odpowiedni przebieg morfogenezy lub rozwój różnych tkanek w czasie u pojedynczej kijanki są zakłócone.

Długość kończyn tylnych

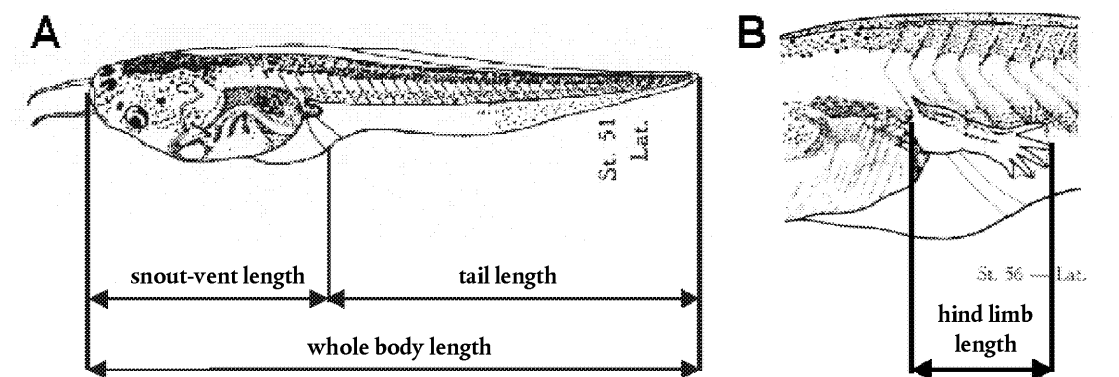
36. Zróżnicowanie i rozwój kończyn tylnych są kontrolowane przez hormony tarczycy i stanowią główne charakterystyczne cechy rozwojowe wykorzystywane już do określania stadium rozwojowego. Rozwój kończyn tylnych jest wykorzystywany do jakościowej oceny stadium rozwojowego, ale tutaj uznawany jest za ilościowy punkt końcowy. W związku z tym długość kończyn tylnych mierzona jest jako punkt końcowy umożliwiający wykrycie wpływu na oś tarczycy (rys. 2). W celu zachowania spójności długość kończyn tylnych mierzy się na lewej kończynie tylnej. Długość kończyn tylnych ocenia się zarówno w 7. dniu, jak i w 21. dniu badania. W 7. dniu mierzenie długości kończyn tylnych jest proste, jak pokazano na rys. 2. Mierzenie długości kończyn tylnych w 21. dniu jest jednak bardziej skomplikowane ze względu na zagięcia kończyny. W związku z tym mierzenie długości kończyn tylnych w 21. dniu powinno rozpoczynać się przy korpusie i następnie wzdłuż środkowej linii kończyny, przechodząc przez wszystkie zgięcia. Zmiany długości kończyn tylnych w 7. dniu, nawet jeżeli nie są widoczne w 21. dniu, są nadal uznawane za znaczące ze względu na potencjalną czynność tarczycy. Pomiar długości pozyskuje się z cyfrowych fotografii, wykorzystując oprogramowanie przeznaczone do analizy obrazu, jak opisano w wytycznej OECD dotyczącej histologii tarczycy płazów (*Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology*) (9).

Długość ciała i masa mokra

37. Oznaczenia długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu (rys. 2) i masy mokrej są zawarte w protokole badań służącym do oceny ewentualnych skutków badanych substancji chemicznych na wskaźnik wzrostu kijanek w porównaniu z grupą kontrolną i są przydatne w wykrywaniu toksyczności ogólnej badanej substancji chemicznej. Ponieważ wysuszenie wody chroniącej skórę kijanek w celu określenia masy może być dla kijanek stresujące oraz powodować uszkodzenie skóry, do pomiarów wykonywanych w 7. dniu wykorzystuje się podpróbę kijanek, a wszystkie pozostałe kijanki są mierzone w dniu zakończenia badania (21. dzień). W celu zachowania spójności do pomiaru należy wykorzystać punkt położony przeciwległe do odbytu od strony czaszkowej jako graniczny punkt pomiaru od strony ogona.
38. Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu wykorzystuje się do oceny wzrostu, jak przedstawiono na rys. 2.

Rysunek 2.

(A) Rodzaje pomiarów długości ciała oraz (B) pomiary długości kończyn tylnych w przypadku kijanek *X. laevis* (1).



Histologia gruczołu tarczowego

39. Chociaż stadium rozwojowe i długość kończyn tylnych stanowią istotne punkty końcowe pozwalające ocenić zmiany w rozwoju metamorficznym związane z narażeniem, opóźnienie w rozwoju nie może samo w sobie zostać uznane za diagnostyczny wskaźnik niekorzystnego oddziaływania na gruczoł tarczowy. Niektóre zmiany mogą zostać zauważone tylko w wyniku rutynowej analizy histopatologicznej. Kryteria diagnostyczne obejmują przerost/atrofię tarczycy, przerost komórek pęcherzykowych, hiperplazję komórek pęcherzykowych, a dodatkowe kryteria jakościowe obejmują światła pęcherzyka tarczycowego, jakość koloidu i wysokość/kształt komórek pęcherzykowych. Należy podać klasyfikację intensywności (4 stopnie). Informacje dotyczące uzyskiwania i przetwarzania próbek dla celów analiz histologicznych i dla celów przeprowadzania analiz histologicznych na próbkach tkanek są dostępne w wytycznych »Badanie przeobrażenia płazów: Część 1 – Wytyczne techniczne pobierania próbek morfologicznych i preparatyki histologicznej« (*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 – Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation*) oraz »Badanie przeobrażenia płazów: Część 2 – Interpretacja badań, kryteria diagnostyczne, klasyfikacja intensywności i krąg szczytowy« (*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas*) (9). Laboratoria przeprowadzające analizę po raz pierwszy powinny zwrócić się o radę do doświadczonych patologów w celu przeszkolenia, zanim przystąpią do analizy histologicznej i oceny tarczycy. Widoczne i znaczące zmiany szczytowych punktów końcowych wskazujące na przyspieszenie rozwoju lub rozwój asynchroniczny mogą wykluczyć konieczność przeprowadzenia analizy histopatologicznej tarczycy. Brak widocznych zmian morfologicznych lub dowodów opóźnień rozwojowych daje jednak podstawy do analiz histologicznych.

Śmiertelność

40. Należy codziennie sprawdzać wszystkie zbiorniki badawcze pod kątem martwych kijanek, których liczbę należy odnotować w odniesieniu do każdego zbiornika. W przypadku wykrycia każdego śmiertelnego przypadku należy odnotować datę, stężenie i numer zbiornika. Martwe zwierzęta należy usunąć ze zbiornika testowego natychmiast po ich zauważeniu. Wskaźnik śmiertelności powyżej 10 % może wskazywać na nieodpowiednie warunki badania lub toksyczny wpływ skutki badanej substancji chemicznej.

Dodatkowe obserwacje

41. Należy odnotować przypadki nietypowego zachowania oraz wyraźnie widocznych wad rozwojowych i uszkodzeń. Każdorazowo w przypadku stwierdzenia nietypowego zachowania, wyraźnie widocznych wad rozwojowych lub uszkodzeń należy odnotować datę, stężenie i numer zbiornika. Normalnie zachowujące się kijanki są zawieszane w słupie wody z ogonem wyżej niż głowa, ich płetwa ogonowa uderza regularnie i rytmicznie, okresowo wynurzają się na powierzchnię, poruszają pokrywami skrzelowymi i reagują na bodźce. Nietypowe zachowania obejmowałyby na przykład unoszenie się na powierzchnię, leżenie na dnie zbiornika, pływanie brzuchem do góry lub w nieregularny sposób, brak wynurzania się na powierzchnię i brak reakcji na bodźce. Ponadto należy rejestrować wyraźne różnice w spożyciu pokarmu występujące między zabiegami. Wyraźnie widoczne wady rozwojowe i uszkodzenia mogą obejmować m.in. nieprawidłowości morfologiczne (np. zdeformowane kończyny), krwawiące uszkodzenia, zakażenia bakteryjne i grzybicze. Ustalenia te mają charakter jakościowy i powinno się je uważać za równoznaczne z klinicznymi objawami choroby/stresu oraz dokonywać, porównując ze zwierzętami z próby kontrolnej. Jeżeli występowanie lub częstotliwość występowania są większe w zbiorniku narażonym na działanie substancji chemicznej niż w próbach kontrolnych, należy je uznać za dowody widocznej toksyczności.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Gromadzenie danych

42. Wszystkie dane należy gromadzić przy użyciu systemów elektronicznych lub ręcznych, które są zgodne z dobrą praktyką laboratoryjną (GLP). Dane uzyskane w ramach badania powinny obejmować poniższe informacje.

Badana substancja chemiczna:

- charakterystyka badanej substancji chemicznej: właściwości fizykochemiczne; informacje dotyczące stabilności i biodegradowalności;
- informacje i dane dotyczące substancji chemicznej: metody i częstotliwości przygotowywania rozcieńczeń; informacje dotyczące badanej substancji chemicznej obejmują rzeczywiste i nominalne stężenia badanej substancji chemicznej oraz, w niektórych przypadkach, w razie potrzeby, niemaczystej substancji chemicznej. Pomiary badanej substancji chemicznej mogą być wymagane w odniesieniu do roztworów podstawowych, jak również do roztworów do badań;
- rozpuszczalnik (jeżeli jest inny niż woda): uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika i charakterystyka rozpuszczalnika (charakter, wykorzystane stężenie).

Warunki badania:

- dokumentacja działań: zawiera obserwacje odnoszące się do funkcjonowania układu badawczego oraz wspierającego środowiska i infrastruktury; typowa dokumentacja obejmuje: temperaturę otoczenia, temperaturę badania, fotoperiod, status najważniejszych części układu narażenia (np. pompy, liczniki cykli, ciśnienia), natężenia przepływu, stany wody, zmiany butelek laboratoryjnych i dokumentacja dotycząca żywienia; ogólne parametry jakości wody obejmują pH, stężenie rozpuszczonego tlenu, przewodność właściwą, łączną zawartość jodu, zasadowość i twardość;
- odchylenia od metody badawczej: te informacje powinny obejmować wszystkie informacje lub opisy odchyleń od metody badawczej.

Wyniki:

- obserwacje biologiczne i dane: obejmują one codzienne obserwacje śmiertelności, spożycia pokarmu, nietypowe zachowanie podczas pływania, letarg, utratę równowagi, wady rozwojowe, uszkodzenia itd. Obserwacje i dane zgromadzone w uprzednio ustalonych odstępach obejmują: stadia rozwojowe, długość kończyn tylnych, długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu i masę mokrą;
- zastosowane techniki statystyczno-analityczne i uzasadnienie zastosowanych technik, wyniki analizy statystycznej, najlepiej w formie tabeli;
- dane histologiczne: obejmują opisy, jak również stopnie ciężkości obserwowanych zmian i częstości ich występowania, jak szczegółowo przedstawiono w wytycznej dotyczącej histopatologii;
- obserwacje *ad hoc*: obserwacje te powinny obejmować opisy badania, które nie mieszczą się we wcześniej opisanych kategoriach.

Raportowanie danych

43. Dodatek 2 zawiera arkusze kalkulacyjne do codziennego gromadzenia danych, które można wykorzystać jako wytyczne dotyczące wprowadzania danych surowych i do obliczania statystyk podsumowujących. Dodatkowo dołączono tabele sprawozdawcze, które ułatwiają przekazywanie zestawień danych dotyczących punktów końcowych. Tabele sprawozdawcze dotyczące oceny histologicznej można znaleźć w dodatku 2.

Kryteria efektywności i akceptowalność/ważność badania

44. Na ogół wyraźne odchylenia od metody badawczej będą prowadziły do uzyskania danych, które będą nie do przyjęcia do celów interpretacji i sprawozdawczości. W związku z tym opracowano następujące kryteria, podane w tabeli 4, jako wytyczne w celu ustalenia jakości przeprowadzonego badania i ogólnej efektywności organizmów kontrolnych.

Tabela 4.

Kryteria efektywności dla badania przeobrażenia płazów.

Kryterium	Dopuszczalne granice
Badane stężenia	Utrzymane na poziomie ≤ 20 % współczynnika zmienności (zmienność mierzonego badanego stężenia) w trakcie 21 dni badania.
Śmiertelność w próbach kontrolnych	≤ 10 % – śmiertelność w dowolnej kontrpróbie w próbach kontrolnych nie powinna przekraczać 2 kijanek.
Minimalna mediana stadium rozwojowego w próbach kontrolnych na koniec badania	57
Rozkład stadium rozwojowego w grupie kontrolnej	10. i 90. percentyl rozkładu stadiów rozwojowych nie powinny różnić się o więcej niż 4 stadia.
Rozpuszczony tlen	≥ 40 % nasycenia powietrzem (*)

Kryterium	Dopuszczalne granice
pH	pH należy utrzymać w przedziale 6,5–8,5. Różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 0,5.
Temperatura wody	22 ± 1 °C – różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 0,5 °C
Badane stężenia bez widocznej toksyczności	≥ 2
Wyniki kontrpróby	W całym badaniu zakłócenia mogą wystąpić w ≤ 2 kontrpróbach.
Szczególne warunki stosowania rozpuszczalnika	Jeżeli stosuje się nośnik rozpuszczalnikowy, należy zastosować próby kontrolne z rozpuszczalnikiem i próby kontrolne z czystą wodą, a wyniki należy zamieścić w sprawozdaniu.
	Statystycznie istotne różnice między próbami kontrolnymi z rozpuszczalnikiem i próbami kontrolnymi z wodą traktuje się w sposób szczególny. Więcej informacji można znaleźć poniżej.
Szczególne warunki stosowania systemu wymiany statycznej	Reprezentatywne analizy chemiczne przed wymianą i po wymianie należy zamieścić w sprawozdaniu.
	Poziom amoniaku należy zmierzyć bezpośrednio przed wymianą.
	Wszystkie parametry jakości wody wymienione w tabeli 1 w dodatku 1 należy mierzyć bezpośrednio przed wymianą.
	Okres wymiany nie powinien przekraczać 72 godzin.
	Odpowiedni schemat żywienia (50 % dziennej dawki pokarmowej dostępnej w handlu paszy dla kijanek).
(*) Napowietrzanie wody można utrzymać za pomocą bełkotek. Zaleca się ustawianie bełkotek na poziomie, który nie powoduje nadmiernego stresu u kijanek.	

Ważność badania

45. Aby badanie zostało zaakceptowane/uznane za ważne, powinno ono spełnić poniższe wymogi:

Ważny eksperyment w badaniu, którego wynik określono jako ujemny pod względem oddziaływania na gruczoł tarczowy:

- (1) w odniesieniu do każdego zabiegu (łącznie z próbami kontrolnymi) śmiertelność nie może przekroczyć 10 %. W odniesieniu do każdej kontrpróby śmiertelność nie może przekroczyć trzech kijanek, w przeciwnym razie kontrpróbę uznaje się za zakłóconą;
- (2) do analizy powinny być dostępne co najmniej dwa poziomy zabiegów ze wszystkimi czterema niezakłóconymi kontrpróbami;
- (3) do analizy powinny być dostępne najmniej dwa poziomy zabiegów bez widocznej toksyczności.

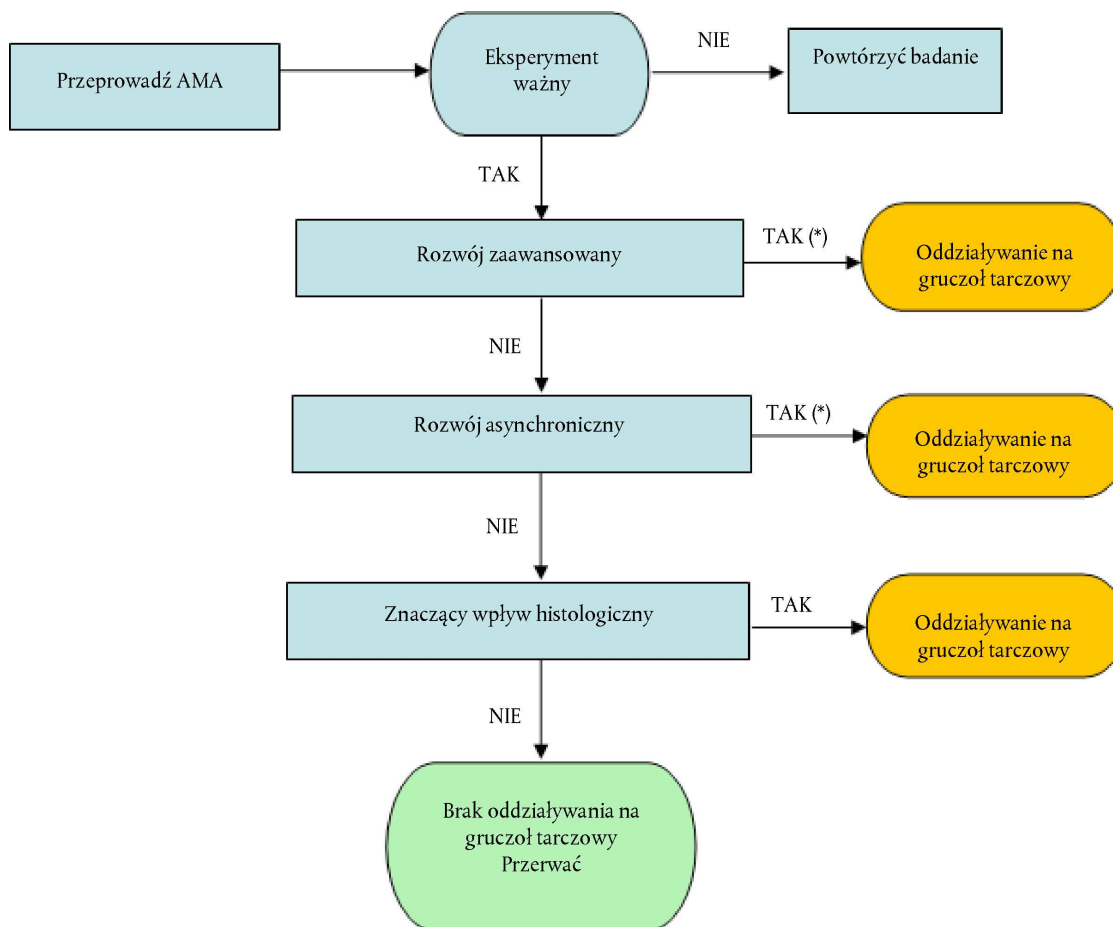
Ważny eksperyment w badaniu, którego wynik określono jako dodatni pod względem oddziaływania na gruczoł tarczowy:

- (1) w grupie kontrolnej śmiertelność nie może być większa niż dwie kijanki na kontrpróbę/grupę kontrolną.

Schemat decyzyjny do przeprowadzenia badania przeobrażenia płazów (AMA)

46. Schemat decyzyjny został opracowany na potrzeby badania przeobrażenia płazów w celu zapewnienia logicznej pomocy przy wykonywaniu i interpretacji wyników testu biologicznego (zob. schemat blokowy na rys. 3). Zasadniczo w schemacie decyzyjnym przypisuje się wagę punktom końcowym, przy czym rozwojowi zaawansowanemu, rozwojowi asynchronicznemu i histopatologii tarczycy przypisuje się dużą wagę, natomiast rozwojowi opóźnionemu, długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu i mokrej masie ciała, czyli parametrom, na które może ewentualnie mieć wpływ toksyczność ogólna, przypisuje się mniejszą wagę.

Rysunek 3.

Schemat decyzyjny na potrzeby badania przeobrażenia płazów (AMA)

(*) Niektóre organy regulacyjne mogą wymagać badania histologicznego mimo znaczących różnic między rozwojem zaawansowanym i asynchronicznym. Jednostkę przeprowadzającą to badanie zachęca się do zasięgnięcia opinii właściwych organów przed przeprowadzeniem badania w celu ustalenia wymaganych punktów końcowych.

Zaawansowany rozwój (określony na podstawie stadium rozwojowego, długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu i długości kończyn tylnych)

47. Wiadomo, że zaawansowany rozwój występuje wyłącznie w wyniku oddziaływań powiązanych z hormonem tarczycy. Mogą to być oddziaływania na tkanki obwodowe, takie jak bezpośrednia interakcja z receptorem hormonu tarczycy (takim jak T4) lub oddziaływania prowadzące do zmian poziomu hormonu tarczycy w układzie krążenia. W obu przypadkach uznaje się to za wystarczający dowód wskazujący, że substancja chemiczna oddziałuje na gruczoł tarczowy. Zaawansowany rozwój ocenia się na jeden z dwóch sposobów. Zgodnie z pierwszym sposobem ogólne stadium rozwojowe można ocenić, stosując metodę standardową, którą opisują szczegółowo Nieuwkoop i Faber (8). Drugi sposób polega na ilościowym określeniu cech morfologicznych, takich jak długość kończyn tylnych, w 7. i 21. dniu, co ma pozytywny związek z agonistycznym wpływem na receptor hormonu tarczycy. Jeżeli występuje istotne pod względem statystycznym przyspieszenie rozwoju lub zwiększenie długości kończyn tylnych, wówczas badanie wskazuje, że substancja chemiczna oddziałuje na gruczoł tarczowy.
48. Ocena zwierząt użytych do badania pod kątem przyspieszonego rozwoju w odniesieniu do populacji kontrolnej będzie oparta na wynikach analiz statystycznych przeprowadzonych w odniesieniu do następujących czterech punktów końcowych:
 - długości kończyn tylnych (znormalizowanej długością mierzoną od otworu gębowego do odbytu) w 7. dniu badania
 - długości kończyn tylnych (znormalizowanej długością mierzoną od otworu gębowego do odbytu) w 21. dniu badania
 - stadium rozwojowego w 7. dniu badania
 - stadium rozwojowego w 21. dniu badania.
49. Analizy statystyczne długości kończyn tylnych należy przeprowadzać na podstawie pomiarów długości lewej kończyny tylnej. Długość kończyn tylnych normalizuje się, przyjmując stosunek długości kończyn tylnych do długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu osobnika. Następnie porównuje się średnią znormalizowanych wartości w odniesieniu do każdego poziomu zabiegu. Znaczące zwiększenie średniej długości (znormalizowanej) kończyn tylnych w badanej grupie poddawanej zabiegowi chemicznemu w porównaniu z grupą kontrolną w 7. lub 21. dniu badania wskazuje wówczas na przyspieszenie rozwoju (zob. dodatek 3).
50. Analizy statystyczne stadium rozwojowego należy przeprowadzać na podstawie ustalania stadiów rozwojowych zgodnie z kryteriami morfologicznymi, które opisują Nieuwkoop i Faber (8). Znaczące zwiększenie wartości stadium rozwojowego w badanej grupie poddawanej zabiegowi chemicznemu w porównaniu z grupą kontrolną w 7. lub 21. dniu badania, wykrytego w drodze analizy wielo-centylowej, wskazuje na przyspieszenie rozwoju.
51. W metodzie badania przeobrażenia płazów znacząca zmiana w którymś z wyżej wspomnianych punktów końcowych jest uznawana za wystarczającą dla wykrycia przyspieszonego rozwoju. Oznacza to, że znaczący wpływ na długość kończyn tylnych w danym momencie nie wymaga potwierdzenia przez znaczący wpływ na długość kończyn tylnych w innym momencie ani znaczący wpływ na stadium rozwojowe w tym danym momencie. Z kolei znaczący wpływ na stadium rozwojowe w danym momencie nie wymaga potwierdzenia przez znaczący wpływ na stadium rozwojowe w innym momencie ani przez znaczący wpływ na długość kończyn tylnych w tym danym momencie. Waga dowodów przyspieszonego rozwoju zwiększy się jednak, jeżeli znaczący wpływ zostanie wykryty w przypadku większej liczby punktów końcowych niż jeden.

Rozwój asynchroniczny (określony na podstawie kryteriów stadium rozwojowego)

52. Rozwój asynchroniczny charakteryzuje się zakłóceniem przebiegu morfogenezy w czasie lub rozwoju różnych tkanek u pojedynczej kijanki. Niezdolność do wyraźnego ustalenia stadium rozwoju organizmu z wykorzystaniem ciągu morfologicznych punktów końcowych uznawanych za typowe dla danego stadium wskazuje, że tkanki rozwijają się asynchronicznie podczas przemiany. Rozwój asynchroniczny stanowi wskaźnik oddziaływania na gruczoł tarczowy. Jedyne znane działanie wywołujące rozwój asynchroniczny polega na wpływie substancji chemicznych na obwodowe działanie hormonu tarczycy lub na metabolizm hormonu tarczycy w rozwijających się tkankach, który obserwuje się na przykład dla inhibitorów dejodynazy.
53. Ocena zwierząt użytych do badania pod kątem rozwoju asynchronicznego w odniesieniu do populacji kontrolnej będzie oparta na bezpośredniej ocenie morfologicznej badanych zwierząt w 7. i 21. dniu badania.
54. Opis prawidłowego rozwoju *Xenopus laevis* u Nieuwkoopa i Fabera (8) stanowi ramy identyfikacji kolejności prawidłowej przebudowy tkanek. Termin »rozwój asynchroniczny« odnosi się konkretnie do tych odchyśleń

w ogólnym rozwoju morfologicznym kijanek, które uniemożliwiają ostateczne ustalenie stadium rozwoju zgodnie z kryteriami Nieuwkoopa i Fabera (8), ponieważ kluczowe charakterystyczne cechy morfologiczne wykazują właściwości różnych stadiów.

55. Jak wskazuje termin »rozwój asynchroniczny«, należy uwzględniać tylko przypadki wykazujące odchylenia w postępie przebudowy konkretnych tkanek względem postępu przebudowy innych tkanek. U niektórych klasycznych fenotypów występuje opóźnienie w pojawieniu się kończyn przednich lub ich brak mimo prawidłowego lub zaawansowanego rozwoju tkanek kończyn tylnych i ogona lub wczesna resorpcja skrzeli w stosunku do stadium morfogenetycznego kończyn tylnych i resorpcji ogona. Zwierzę zostanie zarejestrowane jako rozwijające się asynchronicznie, jeżeli nie można przypisać go do stadium, ponieważ nie spełnia większości kryteriów rozwojowych dotyczących charakterystycznych punktów w odniesieniu do danego stadium Nieuwkoopa i Fabera (8) lub jeżeli występuje skrajne opóźnienie lub przyspieszenie wystąpienia co najmniej jednej kluczowej cechy (np. ogon całkowicie resorbowany, ale kończyny przednie nie powstały). Ocena ta przeprowadzana jest w sposób jakościowy i powinna umożliwić zbadanie pełnego ciągu charakterystycznych cech wymienionych przez Nieuwkoopa i Fabera (8). Nie jest jednak konieczne rejestrowanie stanu rozwoju różnych cech charakterystycznych obserwowanych zwierząt. Zwierzęta zarejestrowane jako wykazujące rozwój asynchroniczny nie są przypisane do stadium rozwojowego Nieuwkoopa i Fabera (8).
56. W związku z tym głównym kryterium wyznaczania przypadków nieprawidłowego rozwoju morfologicznego jako przypadków »rozwoju asynchronicznego« jest zakłócenie odpowiedniego przebiegu przebudowy tkanek i morfogenezy tkanek w czasie, przy czym morfologia narażonych tkanek nie wykazuje wyraźnych nieprawidłowości. Jednym z przykładów ilustrujących tę interpretację ogólnych nieprawidłowości morfologicznych jest to, że opóźniona morfogeneza kończyn tylnych w stosunku do rozwoju innych tkanek spełni kryterium »rozwoju asynchronicznego«, natomiast przypadki braku kończyn tylnych, nieprawidłowej liczby kończyn (np. ektroaktylia, polidaktylia) lub występowanie innych wyraźnych wad rozwojowych kończyn nie powinny być traktowane jako przypadki »rozwoju asynchronicznego«.
57. W tym kontekście główne morfologiczne cechy charakterystyczne, które należy ocenić pod kątem ich skoordynowanego rozwoju metamorficznego, powinny obejmować morfogenezę kończyn tylnych, morfogenezę kończyn przednich, powstanie kończyn przednich, etap resorpcji ogona i morfologię głowy (np. rozmiar skrzeli i etap resorpcji skrzeli, morfologię dolnej szczęki, wystawanie chrząstki Meckela).
58. W zależności od charakteru działania substancji chemicznej mogą wystąpić różne ogólne fenotypy morfologiczne. U niektórych klasycznych fenotypów występuje brak kończyn przednich lub opóźnienie w ich pojawieniu się pomimo prawidłowego lub zaawansowanego rozwoju tkanek kończyn tylnych i ogona lub wczesnej resorpcji skrzeli w stosunku do przebudowy kończyn tylnych i ogona.

Histopatologia

59. Jeżeli substancja chemiczna nie powoduje widocznej toksyczności i nie przyspiesza rozwoju ani nie powoduje rozwoju asynchronicznego, ocenia się histopatologię tarczycy kierując się odpowiednimi wytycznymi (9). Opóźnienie rozwojowe przy braku toksyczności stanowi wyraźny wskaźnik niekorzystnego oddziaływania na gruczoł tarczowy, analiza stadium rozwojowego jest jednak mniej wrażliwa i charakteryzuje się słabszą diagnostyką niż analiza histopatologiczna tarczycy. W związku z tym przeprowadzanie analiz histopatologicznych tarczycy jest w tym przypadku wymagane. Zmiany w histologii tarczycy zostały wykazane przy braku zmian rozwojowych. Jeżeli występują zmiany w histopatologii tarczycy, uważa się, że substancja chemiczna oddziałuje na gruczoł tarczowy. Jeżeli nie zaobserwuje się żadnych opóźnień rozwojowych ani uszkodzeń histologicznych w tarczycy, uważa się, że substancja chemiczna nie oddziałuje na gruczoł tarczowy. Uzasadnienie tej decyzji jest takie, że na gruczoł tarczowy wpływa TSH i każda substancja chemiczna, która wpływa na poziom hormonu tarczycy w układzie krążenia w wystarczającym stopniu, aby zmienić wydzielanie TSH, wywoła zmiany histopatologiczne w tarczycy. Różne tryby i mechanizmy działania mogą powodować zmiany poziomu hormonu tarczycy w układzie krążenia. Tak więc chociaż poziom hormonu tarczycy wskazuje na zmiany związane z tarczycą, nie wystarczy określić, który tryb czy mechanizm działania jest związany z tą reakcją.
60. W związku z tym, że do tego punktu końcowego nie da się zastosować podstawowych metod statystycznych, określenie wpływu związanego z narażeniem na substancję chemiczną powinno nastąpić w oparciu o ekspertyzę patologa.

Rozwój opóźniony (określony na podstawie kryteriów stadium rozwojowego, długości kończyn tylnych, masy ciała, długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu)

61. Opóźniony rozwój może być spowodowany przez mechanizmy antytyroidowe i przez toksyczność pośrednią. Lekkie opóźnienia rozwojowe połączone z widocznymi oznakami toksyczności prawdopodobnie wskazują na niespecyficzne działanie toksyczne. Ocena toksyczności pozatarczycowej stanowi istotną część badania

mającego na celu zmniejszenie prawdopodobieństwa fałszywie dodatnich wyników. Nadmierna śmiertelność stanowi oczywiste wskazanie, że występują inne toksyczne mechanizmy. Podobnie umiarkowane zmniejszenie wzrostu, określone przez masę mokrą lub długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu, również wskazuje na toksyczność pozatarczycową. Widoczne przyspieszenia wzrostu obserwuje się powszechnie w przypadku substancji chemicznych, które mają negatywny wpływ na prawidłowy rozwój. W związku z tym obecność większych osobników nie musi wskazywać na toksyczność pozatarczycową. W celu określenia toksyczności tarczycowej nie należy jednakże polegać wyłącznie na wzroście. Należy raczej wykorzystywać wzrost w połączeniu ze stadium rozwojowym i histopatologią tarczycy w celu określenia oddziaływania na gruczoł tarczowy. Przy określaniu widocznej toksyczności należy raczej uwzględniać również inne punkty końcowe, takie jak obrzęk, uszkodzenia krwotoczne, letarg, ograniczone spożycie pokarmu, nieskoordynowane ruchy lub zmienione zachowanie podczas pływania itp. Jeżeli wszystkie badane stężenia wykazują oznaki widocznej toksyczności, badana substancja chemiczna powinna zostać poddana ponownej ocenie przy niższych badanych stężeniach, zanim określi się, czy ta substancja chemiczna potencjalnie oddziałuje na tarczycę, czy nie.

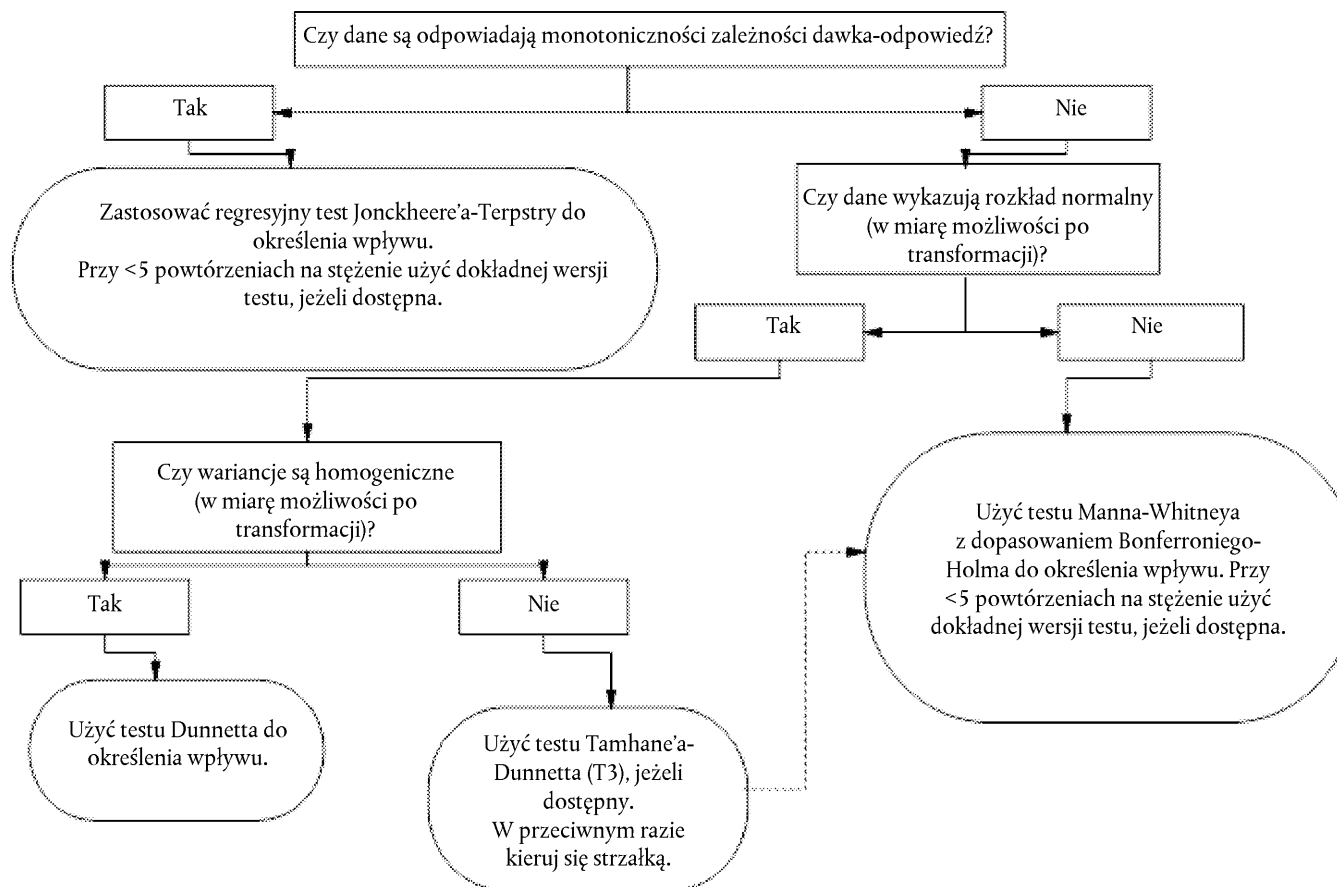
62. Przy braku innych oznak wyraźnej toksyczności istotne statystycznie opóźnienia rozwojowe wskazują, że substancja chemiczna oddziałuje na tarczycę (działanie antagonistyczne). Przy braku istotnych statystycznie reakcji wynik ten może zostać poszerzony o wyniki z histopatologii tarczycy.

Analizy statystyczne

63. Statystyczne analizy danych najlepiej jest wykonywać zgodnie z procedurami opisanymi w dokumencie »Aktualne podejście do statystycznej analizy danych ekotoksyczności: wytyczne stosowania« (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (11). W przypadku wszystkich ciągłych ilościowych punktów końcowych (długości kończyn tylnych, długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu, masy mokrej) zgodnych z monotoniczną zależnością dawka-odpowiedź należy zastosować regresyjny test Jonckheere'a-Terpstry w celu ustalenia istotnego wyniku zabiegu.
64. W przypadku ciągłych punktów końcowych, które nie są zgodne z monotoniczną zależnością dawka-odpowiedź, dane należy oceniać pod kątem normalności (preferuje się stosowanie testu Shapiro-Wilka lub testu Andersona-Darlinga) i jednorodności wariancji (preferuje się stosowanie testu Levene'a). Oba testy przeprowadza się na resztach ANOVA. Zamiast tych formalnych badań normalności i jednorodności wariancji można oprzeć się na swojej najlepszej wiedzy, jednak preferowane są badania formalne. W przypadku stwierdzenia odchylenia od normy lub niejednorodności wariancji, należy dążyć do transformacji normalizującej i stabilizującej wariancję. Jeżeli dane (na przykład po transformacji) mają rozkład normalny o jednorodnej wariancji, określa się istotny wynik zabiegu na podstawie testu Dunnetta. Jeżeli dane (na przykład po transformacji) posiadają rozkład normalny o niejednorodnej wariancji, określa się istotny wynik zabiegu na podstawie testu Tamhane'a-Dunnetta albo testu T3 lub testu U Manna-Whitneya-Wilcoxa. W przypadku gdy nie można ustalić żadnej normalizującej transformacji, istotny wynik zabiegu określa się na podstawie testu U Manna-Whitneya-Wilcoxa z wykorzystaniem dopasowania wartości p Bonferroniego-Holma. Test Dunnetta stosuje się niezależnie od testu ANOVA F, a test Manna-Whitneya stosuje się niezależnie od ogólnego testu Kruskala-Wallisa.
65. Nie przewiduje się istotnej śmiertelności, należy ją jednak ocenić na podstawie regresyjnego testu Cochran-Armitage'a, gdzie dane są zgodne z monotonicznością zależności dawka-odpowiedź, a w innych przypadkach z dokładnym testem Fischera z dopasowaniem Bonferroniego-Holma.
66. Istotny wynik zabiegu dla stadium rozwojowego określa się na podstawie regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry zastosowanego do median kontrprób. Ewentualnie lepiej jest zastosować wielocentylowy test Jonckheere'a od 20. do 80. percentyla do określenia wyniku, ponieważ uwzględnia się w nim zmiany w profilu rozmieszczenia.
67. Właściwą jednostką analizy jest kontrpróba, zatem dane składają się z median kontrprób w przypadku zastosowania testu Jonckheere'a-Terpstry lub testu U Manna-Whitneya lub ze średnich kontrprób, jeżeli stosuje się test Dunnetta. Monotoniczność zależności dawka-odpowiedź można ocenić wzrokowo na podstawie średnich lub median kontrpróby i zabiegu lub na podstawie testów formalnych, takich jak opisane powyżej (11). Przy liczbie kontrprób na zabieg lub próbę kontrolną mniejszej niż pięć należy zastosować wersje dokładnych permutacji tekstów Jonckheere'a-Terpstry i Manna-Whitneya, jeżeli są one dostępne. Poziom istotności statystycznej wszystkich wskazanych testów ocenia się na poziomie istotności 0,05.
68. Rysunek 4 przedstawia schemat blokowy do przeprowadzania testów statystycznych na danych ciągłych.

Schemat blokowy przedstawiający statystyczne metody w odniesieniu do danych będących zmiennymi ciągłymi.

Schemat blokowy do przeprowadzania testów na danych ciągłych



Szczególne warunki analizy danych

Wykorzystanie zakłóconych poziomów zabiegu

69. Przy ustalaniu, czy kontrpróba lub cały zabieg wykazują wyraźną toksyczność i powinny zostać usunięte z analizy, należy uwzględnić kilka czynników. Wyraźną toksyczność definiuje się jako śmiertelność w dowolnej kontrpróbie > 2 , którą można wyjaśnić wyłącznie toksycznością, a nie błędem technicznym. Inne oznaki wyraźnej toksyczności to krwotok, nietypowe zachowania, nietypowe wzorce pływania, brak łaknienia i wszelkie inne kliniczne objawy choroby. W przypadku subletalnych objawów toksyczności niezbędne mogą być oceny jakościowe, które zawsze należy przeprowadzać w odniesieniu do grupy kontrolnej z czystą wodą.

Próby kontrolne z rozpuszczalnikami

70. Użycie rozpuszczalnika należy brać pod uwagę tylko w ostateczności, po uwzględnieniu wszystkich innych opcji wprowadzenia substancji chemicznej. W przypadku zastosowania rozpuszczalnika należy jednocześnie wykonać próbę kontrolną z czystą wodą. Na zakończenie badania należy przeprowadzić ocenę potencjalnego wpływu rozpuszczalnika. Dokonuje się tego porównując statystycznie grupę kontrolną z rozpuszczalnikiem i grupę kontrolną z czystą wodą. Najbardziej właściwe punkty końcowe, które należy uwzględnić w tej analizie, to stadium rozwojowe, długość mierzona od otworu gębowego do odbytu i masa mokra, które mogą zmienić się pod wpływem toksyczności pozatarczycowej. Jeżeli w tych punktach końcowych wykryje się statystycznie istotne różnice między grupą kontrolną z czystą wodą i grupą kontrolną z rozpuszczalnikiem, należy określić punkty końcowe dla zmierzonych wielkości reakcji z wykorzystaniem próby kontrolnej z czystą wodą. Jeżeli nie istnieje żadna statystycznie istotna różnica między próbą kontrolną z czystą wodą i próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem dla wszystkich zmierzonych zmiennych wielkości reakcji, należy określić punkty końcowe badania w odniesieniu do pomiarów wielkości reakcji, wykorzystując w tym celu połączone próby kontrolne z wodą rozcieńczającą i próby kontrolne z rozpuszczalnikiem.

Grupy badane poddane zabiegowi osiągające 60. stadium rozwoju i wyższe

71. Po 60. stadium rozwoju następuje zmniejszenie wymiarów i wagi kijanek ze względu na resorpcję tkanek i zmniejszenie bezwzględnej zawartości wody w ich organizmie. Zatem nie można odpowiednio wykorzystywać pomiarów masy mokrej i długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu w analizach statystycznych, których przedmiotem są różnice w tempie wzrostu. W związku z tym dane dotyczące masy mokrej i długości organizmów $> NF60$ należy odciąć i nie można wykorzystywać ich do analiz średnich lub median kontrprób. Do analizy tych dwóch parametrów związanych ze wzrostem można zastosować dwa różne podejścia.
72. Jedno podejście polega na uwzględnieniu wyłącznie kijanek w stadiach rozwojowych niższych lub równych 60. stadium dla celów analiz statystycznych masy mokrej lub długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu. Uważa się, że podejście to zapewnia uzyskanie wystarczająco szczegółowych informacji na temat intensywności możliwych zmian wzrostu, jeżeli z analiz usuwa się tylko niewielką część zwierząt użytych do badania ($\leq 20\%$). Jeżeli większa liczba kijanek wykazuje rozwój wykraczający poza 60. stadium ($\geq 20\%$) w co najmniej jednym stężeniu nominalnym, w odniesieniu do wszystkich kijanek należy zastosować dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) o zagnieżdżonej strukturze wariancji w celu dokonania oceny wpływu zabiegów chemicznych na wzrost, uwzględniając wpływ zaawansowanego stadium rozwoju na wzrost. Dodatek 3 przedstawia wytyczne dotyczące dwuczynnikowej analizy ANOVA masy i długości.

BIBLIOGRAFIA

- (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. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 77, Paryż.
- (2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 76, Paryż.
- (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. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 92, Paryż.
- (4) OECD (2000): Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, Paryż.

-
- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów, ASTM E729-96(2002), Filadelfia, 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. i Hammermeister, D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, s. 539–551.
 - (8) Nieuwkoop, P.D. i Faber, J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, Nowy Jork.
 - (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 82, Paryż.
 - (10) Dodd, M.H.I. & Dodd, J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts, B. (red.), Academic Press, Nowy Jork, s. 467-599
 - (11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publikacje na temat zdrowia i bezpieczeństwa środowiskowego. Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, Paryż.
 - (12) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; ss. 69–92.
-

Dodatek 1

Tabela 1

Warunki doświadczalne dla 21-dniowego badania przeobrażenia płazów

Zwierzę użyte do badania	Larwy <i>Xenopus laevis</i>	
Etap: początkowe stadium larwalne	51. stadium Nieuwkoop i Fabera	
Okres narażenia	21 dni	
Kryteria wyboru larw	Stadium rozwojowe i długość całkowita (opcjonalnie)	
Badane stężenia	Co najmniej 3 stężenia obejmujące w przybliżeniu jeden rząd wielkości	
System narażenia	Przepływowy (preferowany) lub wymiana statyczna	
Prędkość przepływu układu badawczego	25 ml/min. (pełna wymiana objętości co ok. 2,7 h)	
Podstawowe parametry docelowe/ dni określania	Śmiertelność	Codziennie
	Stadium rozwojowe	7. i 21. dzień
	Długość kończyn tylnych	7. i 21. dzień
	Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu:	7. i 21. dzień
	Mokra masa ciała	7. i 21. dzień
	Histologia tarczycy	21. dzień
Woda rozcieńczająca/ laboratoryjna próba kontrolna	Odchlorowana woda wodociągowa (filtrowana na węglu aktywnym) lub woda laboratoryjna o równoważnych właściwościach	
Zagęszczenie larw	20 larw na naczynie badawcze (5/l)	
Roztwór do badań/ naczynie badawcze	4–10 l (minimalny poziom wody 10–15 cm) / naczynie badawcze ze szkła lub stali nierdzewnej (np. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Kontrpróby	4 naczynia badawcze z kontrpróbą/ badane stężenie i próba kontrolna	
Akceptowalny wskaźnik śmiertelności w próbach kontrolnych	≤ 10 % na naczynie badawcze z kontrpróbą	
Utrwalenie tarczycy	Utrwalona liczba	Wszystkie kijanki (początkowo ocenia się 5 na kontrpróbę)
	Strefa	Głowa lub całe ciało
	Płyn utrwalający	Utrwalacz Davidsona

Karmienie	Pokarm	Sera Micron® lub równoważny
	Ilość / Częstotliwość	Zob. tabela 1 dotycząca schematu żywienia przy wykorzystaniu Sera Micron®
Oświetlenie	Fotoperiod	12 h światła: 12 h ciemności
	Intensywność	600– 2 000 luksów (mierzone na powierzchni wody)
Temperatura wody		22 ± 1 °C
pH		6,5 – 8,5
Stężenie rozpuszczonego tlenu (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % nasycenia powietrzem)
Harmonogram analiz chemicznych próby		Raz na tydzień (4 pobrania/badanie)

Dodatek 2

Tabele sprawozdawcze do gromadzenia danych surowych i zestawień danych

Tabela 1

Informacje ogólne na temat badanej substancji chemicznej

Informacje dotyczące substancji chemicznej:			
Podać badaną substancję chemiczną, jednostki stężenia i zabiegi			
	Badana substancja chemiczna:		
	Jednostki stężenia:		
	Zabieg 1		
	Zabieg 2		
	Zabieg 3		
	Zabieg 4		
	Data (dzień 0):		Podać datę (dd/mm/yy)
	Data (dzień 7):		Podać datę (dd/mm/yy)
	Data (dzień 21):		Podać datę (dd/mm/yy)

Tabela 2

Arkusze do gromadzenia danych surowych z 7. i 21. dnia

DZIEŃ X

DATA: 00/00/00

	Stężenie	Numer zabiegu	Numer kontrpróby	Numer osobnika	Identyfikator osobnika	Stadium rozwojowe	Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (mm)	Długość kończyn tylnych (mm)	Mokra masa całego organizmu (mg)
WIERSZ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIUM	BL	Długość kończyn tylnych	MASA
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							

	Stężenie	Numer za- biegu	Numer kon- trpróby	Numer osobnika	Identyfika- tor osob- nika	Stadium rozwo- jowe	Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (mm)	Długość kończyn tylnych (mm)	Mokra masa ca- łego orga- nizmu (mg)
WIERSZ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIUM	BL	Długość kończyn tylnych	MASA
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							

	Stężenie	Numer za- biegu	Numer kon- trpróby	Numer osobnika	Identyfika- tor osob- nika	Stadium rozwo- jowe	Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (mm)	Długość kończyn tylnych (mm)	Mokra masa ca- łego orga- nizmu (mg)
WIERSZ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIUM	BL	Długość kończyn tylnych	MASA
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							

	Stężenie	Numer za- biegu	Numer kon- trpróby	Numer osobnika	Identyfika- tor osob- nika	Stadium rozwo- jowe	Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (mm)	Długość kończyn tylnych (mm)	Mokra masa ca- łego orga- nizmu (mg)
WIERSZ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIUM	BL	Długość kończyn tylnych	MASA
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							

Tabela 3

Obliczone zestawienia danych dotyczących punktów końcowych z 7. i 21. dnia

TRT	REP	Stadium rozwojowe			Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (mm)		Długość kończyn tylnych (mm)		Masa (mg)	
		MIN	MEDIA-NA	MAX	ŚREDNI-A	ODCHYLENIE STAN-DARDO-WE	ŚREDNI-A	ODCHYLENIE STAN-DARDO-WE	ŚREDNI-A	ODCHYLENIE STAN-DARDO-WE
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!

Uwaga: wartości obliczone w komórkach są powiązane z danymi wprowadzonymi do tabeli 2.

Tabela 4

Dzienne dane dotyczące śmiertelności

Dzień badania	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!																
Liczba kontrprób		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liczba zabiegów		0				0				0				0			

Uwaga: wartości obliczone w komórkach są powiązane z danymi wprowadzonymi do tabeli 1.

Tabela 5

Kryteria jakości wody

Układ narażenia (przepływowy/wymiana statyczna):	
Temperatura:	
Natężenie światła:	
Cykl światło/ciemność:	
Pokarm:	
Częstotliwość karmienia:	
pH wody:	
Stężenie jodu w wodzie użytej do badania:	

Tabela 6

Podsumowanie danych chemicznych

[illegible]

Nazwa systematyczna:																							
Nr CAS:																							
Dzień badania	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!																						

Uwaga: wartości obliczone w komórkach są powiązane z danymi wprowadzonymi do tabeli 1.

Tabela 7

Histopatologiczne tabele sprawozdawcze dotyczące podstawowych kryteriów

Data:

Substancja chemiczna:

Patolog:

Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej - kontrpróba 1			Przerost gruczołu tarczowego	Atrofia gruczołu tarczowego	Przerost komórek pęcherzykowych	Hiperplazja komórek pęcherzykowych
Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej - kontrpróba 2						
Ogółem:						

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrpróba 1			Przerost gruczołu tarczowego	Atrofia gruczołu tarczowego	Przerost komórek pęcherzykowych	Hiperplazja komórek pęcherzykowych
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrpróba 2						
Ogółem:						

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrpróba 1			Przerost gruczołu tarczowego	Atrofia gruczołu tarczowego	Przerost komórek pęcherzykowych	Hiperplazja komórek pęcherzykowych
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrpróba 2						
Ogółem:						

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrpróba 1			Przerost gruczołu tarczowego	Atrofia gruczołu tarczowego	Przerost komórek pęcherzykowych	Hiperplazja komórek pęcherzykowych
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrpróba 2						
Ogółem:						

Tabela 8

Dodatkowe kryteria histopatologiczne

Data:

Substancja chemiczna:

Patolog:

Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej - kontrolna 1					Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej - kontrolna 2					Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Ogółem:						

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrolna 1					Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrolna 2					Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Ogółem:						

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrolna 1					Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrolna 2					Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Ogółem:						

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrolna 1					Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrolna 2					Powiększenie światła pęcherzyka tarczycowego	Zmniejszenie światła pęcherzyka tarczycowego
Ogółem:						

Tabela 9

Opis wyników badań histopatologicznych

Data:

Substancja chemiczna:

Patolog:

		Opis
Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej - kontrolna 1		
Identyfikator zwierzęcia z próby kontrolnej - kontrolna 2		
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrolna 1		
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrolna 2		

Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrpróba 1		
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrpróba 2		
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrpróba 1		
Identyfikator zwierzęcia z grupy dawkowania - kontrpróba 2		

Tabela 10

Wzór zbiorczej tabeli sprawozdawczej w odniesieniu do dnia x (7 lub 21) badania przeobrażenia płazów

		Próba kontrolna				Dawka 1					Dawka 2					Dawka 3				
Punkt końcowy	Kontrpróba	Średnia	SD	CV	N	Średnia	SD	CV	N	wartość p	Średnia	SD	CV	N	wartość p	Średnia	SD	CV	N	wartość p
Długość kończyn tylnych (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Średnia:																			
Długość mierzona od otworu gębowego do odbytu (SVL) (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Średnia:																			
Masa mokra (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Średnia:																			

Tabela 11

Wzór zbiorczej tabeli sprawozdawczej w odniesieniu do danych dotyczących stadium rozwojowego z dnia x (7. lub 21.) badania przeobrażenia płazów (AMA)

		Próba kontrolna				Dawka 1					Dawka 2					Dawka 3				
	Kontrpróba	Mediana	Min	Maks	N	Mediana	Min	Maks	N	wartość p	Mediana	Min	Maks	N	wartość p	Mediana	Min	Maks	Mediana	wartość p
Stadium rozwojowe	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Średnia:																			

Dodatek 3

Alternatywna analiza masy i długości w przypadku zaawansowanego stadium rozwoju u ponad 20 % kijanek w co najmniej jednym stężeniu

Jeżeli większa liczba kijanek wykazuje tendencje rozwojowe wykraczające poza 60. stadium ($\geq 20\%$) w co najmniej jednym stężeniu nominalnym, w odniesieniu do wszystkich kijanek należy zastosować dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) o zagnieżdżonej strukturze wariancji w celu dokonania oceny wpływu zabiegów chemicznych na wzrost, uwzględniając wpływ zaawansowanego stadium rozwoju na wzrost.

Proponuje się wykorzystanie wszystkich danych, uwzględniając wpływ zaawansowanego stadium rozwoju. Można tego dokonać za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA o zagnieżdżonej strukturze wariancji. W pozycji LateStage podać „tak” w odniesieniu do zwierzęcia, jeżeli jego stadium rozwojowe to co najmniej 61. stadium. W przeciwnym razie w pozycji LateStage podać „nie”. Następnie można wykonać dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA obejmującą stężenie i pozycję LateStage oraz ich interakcję, przyjmując czynnik losowy Rep(Conc) i inny efekt losowy Tadpole(Rep). Rep jest tu jeszcze traktowane jako jednostka analizy i zasadniczo pozwala na osiągnięcie takich samych wyników jak ważona analiza wartości średnich rep*latestage, ważona liczbą zwierząt w stosunku do wartości średniej. Jeżeli dane naruszają wymogi normalności lub jednorodności analizy wariancji ANOVA, można wykonać znormalizowaną transformację hierarchii, aby pozbyć się tego zastrzeżenia.

Oprócz standardowych testów F ANOVA w odniesieniu do efektów Conc, LateStage i ich interakcji, test F interakcji można podzielić na dwa dodatkowe testy F ANOVA, jeden dotyczący średnich reakcji w poszczególnych stężeniach w odniesieniu do LateStage=„nie” i drugi dotyczący średnich reakcji w poszczególnych stężeniach w odniesieniu do LateStage=„tak”. Dalsze porównania średnich z grup poddawanych zabiegowi z próbą kontrolną wykonuje się w ramach każdego poziomu zaawansowanego stadium. Analizę trendu można wykonać, stosując odpowiednie przeciwieństwa, lub można dokonać zwykłego porównania par, jeżeli istnieją dowody niemonotonnej zależności dawka-odpowiedź w ramach poziomu zmiennej stadium zaawansowanego. Korekty wartości p metodą Bonferroni-Holma dokonuje się jedynie wówczas, gdy odpowiednia część F rozkładu nie jest znacząca. Można dokonać tego za pomocą systemu SAS oraz przypuszczalnie za pomocą innych pakietów oprogramowania statystycznego. Komplikacje mogą pojawić się w przypadku gdy w niektórych stężeniach nie występują zwierzęta w zaawansowanym stadium rozwoju, ale z takimi sytuacjami można jednak poradzić sobie w zwykły sposób.

*Dodatek 4***Definicje**

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna: oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej

C.39. BADANIE ROZRODCZOŚCI SKOCZOGONKÓW (COLLEMBOLA) W GLEBIE

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 232 (2009 r.) w sprawie badań. Metoda ma na celu dokonanie oceny wpływu substancji chemicznych na zdolność rozrodczą skoczogonków w glebie. Jest ona oparta na obowiązujących procedurach (1) (2). Partenogenetyczne *Folsomia candida* i rozmnażające się płciowo *Folsomia fimetaria* stanowią dwa najbardziej dostępne gatunki skoczogonków, które dają się hodować i są dostępne na rynku. Jeżeli ma być dokonana ocena określonych siedlisk, w których nie występują wspomniane dwa gatunki, procedurą można również objąć inne gatunki skoczogonków, jeżeli są w stanie spełnić kryteria ważności badania.
2. Żyjące w glebie skoczogonki są gatunkiem istotnym pod względem ekologicznym dla badań ekotoksykologicznych. Skoczogonki to sześcionogi z cienkim egzoszkieletem o wysokiej przepuszczalności powietrza i wody, reprezentujące gatunek stawonogów o innej drodze i stopniu narażenia niż dżdżownice i wazonkowce.
3. Zagęszczenie populacji skoczogonków w glebie i warstwach opadłych liści wielu ekosystemów lądowych zwykle osiąga 10^5 m^{-2} (3) (4). Dorosłe osobniki zwykle mierzą 0,5–5 mm, ich udział w całkowitej biomase glebowej i zwierzęcej oraz w respiracji jest niski, szacowany na 1–5 % (5). W związku z tym ich najważniejszą rolę może stanowić funkcjonowanie w charakterze potencjalnych regulatorów procesów jako mikrobiowory i drapieżniki żerujące na mikrofaunie. Skoczogonki stanowią pokarm wielu różnych bezkręgowców zasiedlających powierzchnię gleby i glebę, takich jak roztocza, pareczniki, pająki, biegaczowate i kusakowate. Skoczogonki przyczyniają się do procesów rozkładu w glebach kwaśnych, w których mogą być najważniejszym bezkręgowcem żyjącym w glebie, poza wazonkowcami, ponieważ dżdżownice i dwuparce zwykle nie występują w takich glebach.
4. Gatunek *F. fimetaria* występuje na całym świecie i powszechnie zamieszkuje kilka rodzajów gleb, poczynawszy od gleb piaszczystych po gliniaste oraz od gleb mułowych po gleby próchnicowe typu mor. Skoczogonki należące do tego gatunku nie posiadają oczu i są bezbarwne. Ich obecność odnotowano w glebach uprawnych w całej Europie (6). Gatunek ten jest wszytkożerny, a jego pokarm obejmuje strzępki grzybni, bakterie, pierwotniaki i detrytus. Istnieje związek między żerowaniem tego gatunku a infekcjami roślin grzybami chorobotwórczymi (7) oraz może on mieć wpływ na mikoryzę, jak to ma miejsce w przypadku *F. candida*. Podobnie jak większość gatunków skoczogonków, *F. candida* rozmnaża się płciowo i do zapłodnienia wymaga stałej obecności samców.
5. *F. candida* również występuje na całym świecie. Chociaż nie występuje powszechnie w większości naturalnych gleb, często licznie występuje w miejscach bogatych w próchnicę. Skoczogonki należące do tego gatunku nie posiadają oczu i są bezbarwne. Posiadają dobrze rozwinięte widelki skokowe (organ służący do skakania), szybko się przemieszczają, biegając i bez trudu skacząc, jeżeli poczują zagrożenie. Ekologiczna rola *F. candida* jest podobna do roli *F. fimetaria*, ale jego siedlisko stanowią gleby o bardziej organicznym charakterze. Rozmnaża się za pomocą partenogenezy. Samce występują w liczbie mniejszej niż jeden na tysiąc.

ZASADA BADANIA

6. Synchroniczne dorosłe (*F. fimetaria*) lub młode (*F. candida*) skoczogonki są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej w określonym zakresie stężeń domieszanej do zmodyfikowanej sztucznej gleby (8) z wykorzystaniem 5 % zawartości związków organicznych (lub gleby alternatywnej). Scenariusz badania można podzielić na dwa etapy:
 - badanie służące wyznaczeniu zakresu stężeń, w przypadku gdy brakuje dostatecznych informacji dotyczących toksyczności, w którym śmiertelność i rozmnażanie stanowią główne punkty końcowe oceniane po 2 tygodniach w odniesieniu do *F. fimetaria* i po 3 tygodniach w odniesieniu do *F. candida*;
 - ostateczne badanie rozrodczości, w którym ocenie podlega całkowita liczba młodych osobników wyprodukowanych przez zwierzęta rodzicielskie oraz przeżycie zwierząt rodzicielskich. Czas trwania badania ostatecznego wynosi 3 tygodnie w odniesieniu do *F. fimetaria* lub 4 tygodnie w odniesieniu do *F. candida*.

Toksyczne oddziaływanie badanych substancji chemicznych na śmiertelność i zdolność rozrodczą osobników dorosłych wyrażono jako LC_x i EC_x , dopasowując dane do odpowiedniego modelu za pomocą regresji nieliniowej w celu oszacowania stężenia, które mogłoby spowodować x % śmiertelności lub ograniczenie zdolności rozrodczej, odpowiednio, lub alternatywnie jako wartość NOEC/LOEC (9).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

7. W miarę możliwości należy znać właściwości fizyczne, rozpuszczalność w wodzie, $\log K_{ow}$, współczynnik podziału gleba/woda oraz prężność par badanej substancji chemicznej. Pożądane są dodatkowe informacje na temat losów badanej substancji chemicznej w glebie, takie jak wskaźniki fotolizy i hydrolizy i rozkład biotyczny. Należy udokumentować tożsamość chemiczną badanej substancji chemicznej zgodnie z nomenklaturą IUPAC, numerem CAS, partią, serią, wzorem strukturalnym i stopniem czystości, jeżeli dane te są dostępne.
8. Niniejszą metodę badawczą można stosować w odniesieniu do substancji chemicznych rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych w wodzie. Sposób podawania badanej substancji chemicznej będzie się jednak odpowiednio różnił. Metoda badawcza nie ma zastosowania do lotnych substancji chemicznych, np. substancji chemicznych, w odniesieniu do których stała Henry'ego lub współczynnik podziału powietrze/woda są większe niż jeden, lub substancji chemicznych, w odniesieniu do których prężność par przekracza 0,0133 Pa w temperaturze 25 °C.

WAŻNOŚĆ BADANIA

9. Aby wynik badania był ważny, powinny być spełnione następujące kryteria dotyczące prób kontrolnych niepoddanych działaniu substancji:
 - średnia śmiertelność osobników dorosłych na koniec badania nie powinna przekraczać 20 %;
 - średnia liczba osobników młodych w każdym naczyniu na koniec badania powinna wynosić co najmniej 100;
 - współczynnik zmienności obliczony w odniesieniu do liczby osobników młodych powinien być niższy niż 30 % na koniec ostatecznego badania.

CHEMICZNA SUBSTANCJA ODNIESIENIA

10. Chemiczną substancję odniesienia należy badać przy stężeniu EC_{50} w odniesieniu do wybranego rodzaju gleby użytej do badań, w równych odstępach czasu albo ewentualnie w trakcie każdego badania, w celu sprawdzenia, czy reakcja organizmów użytych do badania w systemie badawczym mieści się w normie. Odpowiednią chemiczną substancją odniesienia jest kwas borowy, który przy zawartości około 100 mg/kg suchej masy gleby powinien ograniczyć rozrodczość do 50 % (10) (11) w odniesieniu do obu gatunków.

OPIS BADANIA

Naczynia i sprzęt użyte do badań

11. Odpowiednimi naczyniami badawczymi są pojemniki mogące pomieścić 30 g wilgotnej gleby. Pojemnik powinien być wykonany ze szkła lub obojętnego tworzywa sztucznego (nietoksycznego). Jeżeli narażenie na działanie substancji chemicznej ulega zmniejszeniu z powodu sorpcji, należy jednak unikać stosowania pojemników z tworzywa sztucznego. Przekrój naczynia badawczego powinien mieć powierzchnię, która umożliwia uzyskanie w naczyniu do badań rzeczywistej warstwy gleby o grubości 2–4 cm. Naczynia powinny mieć pokrywki (np. szklane lub z polietylenu), które mają ograniczyć parowanie wody, jednocześnie umożliwiając wymianę gazu między glebą a atmosferą. Pojemnik powinien być przynajmniej częściowo przezroczysty, aby zapewnić przepuszczalność światła.
12. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, obejmujące w szczególności:
 - suszarkę szafkową;
 - mikroskop stereoskopowy;
 - pehametr i luksomierz;
 - odpowiednie dokładne wagi;
 - odpowiedni sprzęt do regulacji temperatury;
 - odpowiedni sprzęt do regulacji wilgotności powietrza (nie jest konieczny, jeżeli naczynia narażone na działanie substancji są przykryte pokrywkami);
 - inkubator lub małe pomieszczenie z regulacją temperatury;
 - szczypczyki lub urządzenie o małej sile zasysania powietrza.

Przygotowanie gleby do badania

13. Stosuje się zmodyfikowaną sztuczną glebę (8) o zawartości związków organicznych wynoszącej 5 %. Można ewentualnie wykorzystać naturalną glebę, ponieważ sztuczna gleba nie przypomina naturalnych gleb. Zalecany skład sztucznej gleby jest następujący (w oparciu o masy suche, suszone do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C):
- 5 % torfu sfagnowego, suszonego na powietrzu i drobno zmielonego (dopuszczalna wielkość cząstek 2 ± 1 mm);
 - 20 % glinki kaolinowej (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);
 - około 74 % przemysłowego piasku suszonego na powietrzu (w zależności od potrzebnej ilości CaCO_3), głównie drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek ma wymiary 50–200 mikronów. Dokładna ilość piasku zależy od zawartości CaCO_3 (zob. poniżej), razem powinny stanowić 75 %;
 - 1,0 % węgla wapnia (sproszkowany CaCO_3 do analizy), aby otrzymać $\text{pH } 6,0 \pm 0,5$; ilość dodawanego węgla wapnia może zależeć przede wszystkim od jakości/charakteru torfu (zob. uwaga 1).

Uwaga 1: Ilość potrzebnego CaCO_3 będzie zależna od składników podłoża gleby i należy ją oznaczyć, dokonując bezpośrednio przed badaniem pomiaru pH próbek wilgotnej gleby poddanej wstępnej inkubacji.

Uwaga 2: Zaleca się dokonanie pomiaru pH i opcjonalnie wskaźnika C/N, pojemności wymiany kationów (PWK) oraz zawartości związków organicznych gleby, aby umożliwić normalizację na późniejszym etapie oraz aby lepiej zinterpretować wyniki.

Uwaga 3: W miarę potrzeby, np. do celów związanych z konkretnymi badaniami, naturalne gleby z niezanieczyszczonych obszarów mogą również służyć za podłoże do badań lub hodowli. Jeżeli jednak używa się gleby naturalnej, to nie powinna być ona zanieczyszczona i należy określić co najmniej jej pochodzenie (miejsce pobrania), pH, teksturę (rozkład wielkości cząstek), pojemności wymiany kationów (PWK) oraz zawartość związków organicznych. W przypadku naturalnej gleby zaleca się, przed jej wykorzystaniem do badania ostatecznego, wykazać jej przydatność do badań i stosowność w odniesieniu do spełnienia kryteriów ważności.

14. Suche składniki gleby dokładnie miesza się (np. w dużym mieszalniku laboratoryjnym). Maksymalną pojemność wodną sztucznej gleby określa się zgodnie z procedurami opisanymi w dodatku 5. Zawartość wilgoci w badanej próbce gleby powinna być zoptymalizowana w celu uzyskania luźnej, porowatej struktury gleby umożliwiającej skoczogonom wejście w pory. Zwykle wynosi ona 40–60 % maksymalnej pojemności wodnej.
15. Na 2–7 dni przed rozpoczęciem badania suchą sztuczną glebę nawilża się wstępnie dodając odpowiednią ilość wody dejonizowanej w celu uzyskania około połowy końcowej zawartości wody dla zrównoważenia/ustabilizowania kwasowości. W celu określenia pH stosuje się mieszaninę gleby i 1 M roztworu chlorku potasu (KCl) lub 0,01 M roztworu chlorku wapnia (CaCl_2) w stosunku 1:5 (zgodnie z dodatkiem 6). Jeżeli kwasowość gleby przekracza wymagany zakres, można ją dostosować, dodając odpowiednią ilość CaCO_3 . Jeżeli gleba jest zbyt alkaliczna, można to skorygować, dodając kwasu nieorganicznego nieszkodliwego dla skoczogonków.
16. Wstępnie nawilżoną glebę dzieli się na części odpowiadające liczbie badanych stężeń (i, w stosownych przypadkach, chemicznej substancji odniesienia) oraz prób kontrolnych zastosowanych w badaniu. Dodaje się badane substancje chemiczne i reguluje się zawartość wody, zgodnie z pkt 24.

Wybór i przygotowanie zwierząt użytych do badania

17. Zalecanym gatunkiem jest partenogeniczny *F. candida*, ponieważ w porównaniach międzylaboratoryjnych metody badawczej (11) gatunek ten spełniał kryteria ważności dla przeżycia częściej niż *F. fimetaria*. W przypadku wykorzystania alternatywnego gatunku powinien on spełniać kryteria ważności określone w pkt 9. Na początku badania zwierzęta powinny być dobrze odżywione, wiek *F. fimetaria* powinien wynosić 23–26 dni, a wiek *F. candida* 9–12 dni. W każdej kontrpróbie liczba *F. fimetaria* powinna wynosić 10 samców i 10 samic, a w przypadku *F. candida* należy użyć 10 samic (zob. dodatek 2 i 3). Synchroniczne zwierzęta są losowo wybierane z naczynia i sprawdzane pod kątem stanu zdrowia i stanu fizycznego dla każdej partii dodanej do kontrpróby. Każdą grupę 10/20 osobników dodaje się do losowo wybranego pojemnika badawczego; należy wybrać duże samice *F. fimetaria* w celu odróżnienia ich od samców *F. fimetaria*.

Przygotowywanie badanych stężeń

18. Można wykorzystać cztery metody dodawania badanej substancji chemicznej: 1) wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą z wykorzystaniem wody jako nośnika, 2) wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą z wykorzystaniem rozpuszczalnika organicznego jako nośnika, 3) wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą z wykorzystaniem piasku jako nośnika lub 4) pokrycie powierzchni gleby badaną substancją chemiczną. Wybór odpowiedniej metody zależy od właściwości substancji chemicznej oraz od celu badania. Zwykle zaleca się wymieszanie badanej substancji chemicznej z glebą. Mogą być jednak wymagane procedury dodawania, które są zgodne z praktycznym wykorzystaniem badanej substancji chemicznej (np. opryskiwanie płynną postacią lub zastosowanie specjalnych postaci pestycydów, takich jak granulki lub zaprawy do nasion). Gleba poddawana jest działaniu substancji chemicznej przed dodaniem skoczogonków, chyba że badaną substancją chemiczną pokrywa się powierzchnię gleby, wówczas wpuszczenie skoczogonków do gleby powinno być dozwolone.

Badana substancja chemiczna rozpuszczalna w wodzie

19. Roztwór badanej substancji chemicznej przygotowuje się w wodzie dejonizowanej w ilości wystarczającej do wszystkich kontrprób w ramach jednego badanego stężenia. Przed wprowadzeniem do naczynia badawczego każdy roztwór badanej substancji chemicznej jest dokładnie mieszany z jedną partią wstępnie nawilżonej gleby.

Badana substancja chemiczna nierozpuszczalna w wodzie

20. W przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w wodzie, ale rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych, badana substancja chemiczna może być rozpuszczona w jak najmniejszej objętości odpowiedniego rozpuszczalnika (np. w acetonie); należy zapewnić właściwe wymieszanie substancji chemicznej z glebą oraz wymieszanie z wymaganą częścią piasku kwarcowego. Należy stosować jedynie lotne rozpuszczalniki. Jeżeli stosuje się rozpuszczalnik organiczny, wszystkie badane stężenia i ujemne próby kontrolne z dodatkowym rozpuszczalnikiem powinny zawierać tę samą minimalną ilość rozpuszczalnika. Pojemniki, w których zastosowano rozpuszczalniki, należy pozostawić bez przykrycia na pewien okres czasu, aby umożliwić odparowanie rozpuszczalnika związanego z podaniem badanej substancji chemicznej, zapewniając przez ten czas brak rozproszenia toksycznej substancji chemicznej.

Badana substancja chemiczna słabo rozpuszczalna w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych

21. W przypadku substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie oraz w rozpuszczalnikach organicznych piasek kwarcowy, który powinien stanowić część całego piasku dodawanego do gleby, miesza się z badaną substancją chemiczną w celu otrzymania pożądanego badanego stężenia. Taką mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do uprzednio zwilżonej gleby i dokładnie miesza po dodaniu odpowiedniej ilości dejonizowanej wody w celu otrzymania wymaganej zawartości wilgoci. Otrzymaną mieszaninę przekłada się do naczyń badawczych. Procedurę tę powtarza się dla każdego badanego stężenia, a także przygotowuje się odpowiednią próbę kontrolną.

Pokrycie powierzchni gleby badaną substancją chemiczną

22. Jeżeli substancja chemiczna jest pestycydem, właściwe może być zastosowanie jej na powierzchnię gleby przez rozpylenie. Glebę poddaje się działaniu substancji chemicznej po wprowadzeniu do gleby skoczogonków. Najpierw napełnia się pojemniki badawcze nawilżonym podłożem glebowym i wprowadza zwierzęta, a następnie waży się pojemnik badawczy. Aby uniknąć bezpośredniego narażenia zwierząt na badaną substancję chemiczną przez kontakt bezpośredni, dodaje się ją co najmniej pół godziny przed wprowadzeniem skoczogonków. Badaną substancję chemiczną należy rozprowadzić na powierzchni gleby jak najbardziej równomiernie, korzystając z odpowiednich laboratoryjnych urządzeń rozpylających symulujących opryski w terenie. Wahań temperatury przy rozprowadzaniu substancji nie powinny przekraczać ± 2 °C, a w przypadku roztworów wodnych, emulsji lub zawiesin dawka podawanej wody powinna być zgodna z zaleceniami dotyczącymi oceny ryzyka. Dawkę należy zweryfikować za pomocą odpowiedniej techniki kalibracji. Szczególne postacie, takie jak granulki lub zaprawy do nasion, można stosować w sposób zgodny z rolniczym użytkowaniem gruntów. Pokarm podaje się po rozpyleniu.

PROCEDURA**Warunki badania**

23. Średnia temperatura, w której należy prowadzić badanie, powinna wynosić 20 ± 1 °C przy zakresie temperatur 20 ± 2 °C. Badanie przeprowadza się w warunkach kontrolowanych cykli światło-ciemność (najlepiej 12 godzin światła i 12 godzin ciemności) z natężeniem światła na obszarze z naczyniami badawczymi na poziomie 400–800 luksów.

24. W celu kontrolowania wilgotności gleby naczynia waży się na początku, w trakcie i na koniec badania. Utratę masy > 2 % uzupełnia się dodając wody dejonizowanej. Należy zauważyć, że utratę wody można ograniczyć dzięki utrzymaniu wysokiej wilgotności powietrza (> 80 %) w inkubatorze badawczym.
25. pH należy mierzyć na początku i na końcu badania ustalającego zakres stężeń i badania ostatecznego. Pomiary należy wykonać w jednej dodatkowej próbie kontrolnej i jednej dodatkowej próbie spośród próbek gleby poddanej działaniu substancji (wszystkie stężenia), przygotowanych i utrzymywanych w taki sam sposób jak hodowle badane, ale bez wprowadzania skoczogonków.

Procedura badania i pomiary

26. W odniesieniu do każdego badanego stężenia w naczyniu badawczym umieszcza się ilość badanej gleby odpowiadającą 30 g mokrej masy. Przygotowuje się również próby kontrolne z wodą niezawierającą badanej substancji chemicznej. Jeżeli zastosowano nośnik w celu dodania badanej substancji chemicznej, oprócz serii prób badanych należy przygotować jedną serię prób kontrolnych zawierających sam nośnik. Stężenie rozpuszczalnika lub środka dyspergującego powinno być takie samo jak stężenie zastosowane w naczyniach badawczych zawierających badaną substancję chemiczną.
27. Pojedyncze skoczogonki przenosi się ostrożnie do każdego z naczyń badawczych (przydziela się je losowo do naczyń przeznaczonych do badania) i umieszcza na powierzchni gleby. W celu sprawnego przeniesienia zwierząt można wykorzystać urządzenie o małej sile zasysania powietrza. Liczba kontrprób w odniesieniu do badanych stężeń oraz w odniesieniu do prób kontrolnych zależy od zastosowanego projektu badania. Naczynia badawcze rozmieszcza się losowo w inkubatorze do badań i losowo zmienia ich położenie raz na tydzień.
28. W przypadku dwudziestu badanych dorosłych osobników *F. fimetaria* w jednym naczyniu badawczym należy umieścić 10 samców i 10 samic w wieku 23–26 dni. W 21. dniu skoczogonki wyjmują się z gleby i liczy. W odniesieniu do *F. fimetaria* w zsynchronizowanej partii zwierząt wykorzystanych w badaniu płeć rozróżnia się na podstawie rozmiaru. Samice są wyraźnie większe od samców (zob. dodatek 3).
29. W przypadku badanych osobników *F. candida* w jednym naczyniu badawczym należy umieścić dziesięć 9–12-dniowych młodych osobników. W 28. dniu skoczogonki wyjmują się z gleby i liczy.
30. Jako odpowiednie źródło pokarmu na początku badania i po upływie około dwóch tygodni do każdego pojemnika dodaje się wystarczającą ilość, np. 2–10 mg, granulowanych suszonych drożdży piekarskich, dostępnych w handlu do użytku domowego.
31. Na końcu badania określa się śmiertelność i rozrodczość. Po upływie trzech (*F. fimetaria*) lub czterech tygodni (*F. candida*) wyjmują się skoczogonki z badanej gleby (zob. dodatek 4) i liczy (12). Skoczogonka uznaje się za martwego, jeżeli nie na go wśród skoczogonków wyjętych z gleby. Metodę wyjmowania i liczenia należy zwalidować. Walidacja obejmuje skuteczność wyjmowania osobników młodych przekraczającą 95 % np. dzięki dodaniu znanej liczby osobników do gleby.
32. Praktyczne podsumowanie i harmonogram dotyczący procedury badania znajdują się w dodatku 2.

Projekt badania

Badanie ustalające zakres stężeń

33. W stosownych przypadkach badanie ustalające zakres stężeń przeprowadza się np. stosując pięć stężeń badanej substancji chemicznej 0,1, 1,0, 10, 100 i 1 000 mg/kg suchej masy gleby oraz dwie kontrpróby w odniesieniu do każdego zabiegu i próbę kontrolną. Dodatkowe informacje (dotyczące śmiertelności i rozrodczości skoczogonków) uzyskane na podstawie badań podobnych substancji chemicznych lub literatury mogą okazać się przydatne również przy podejmowaniu decyzji dotyczącej zakresu stężeń, jakie mają zostać użyte w badaniu służącym wyznaczaniu zakresu stężeń.
34. Czas trwania badania ustalającego zakres stężeń wynosi dwa tygodnie w przypadku *F. fimetaria* i 3 tygodnie w przypadku *F. candida* w celu zapewnienia jednego wylęgu osobników młodych. Na końcu badania określa się śmiertelność i rozrodczość skoczogonków. Należy odnotować liczbę osobników dorosłych i występowanie osobników młodych.

Badanie ostateczne

35. W celu wyznaczenia EC_x (np. EC_{10} , EC_{50}) należy poddać badaniom dwanaście stężeń. Zaleca się wykonanie co najmniej dwóch kontrprób w odniesieniu do każdego zabiegu z badanym stężeniem oraz sześciu kontrprób kontrolnych. Współczynnik rozstawienia stężeń może różnić się w zależności od schematu dawka-odpowiedź.
36. W celu wyznaczenia NOEC/LOEC należy zbadać co najmniej pięć stężeń uporządkowanych w szeregu geometrycznym. Zalecane są cztery kontrpróby w odniesieniu do każdego zabiegu z badanym stężeniem i osiem prób kontrolnych. Wielkości stężeń powinny być rozstawione ze współczynnikiem nieprzekraczającym 1,8.
37. Łączone podejście umożliwia wyznaczenie zarówno NOEC/LOEC, jak i EC_x . W odniesieniu do łączonego podejścia należy użyć w zabiegach osiem stężeń w szeregu geometrycznym. Zaleca się wykonanie czterech kontrprób w odniesieniu do każdego zabiegu i ośmiu prób kontrolnych. Wielkości stężeń powinny być rozstawione ze współczynnikiem nieprzekraczającym 1,8.
38. Jeżeli w badaniu ustalającym zakres stężeń w przypadku najwyższego stężenia (tj. 1 000 mg/kg) nie zaobserwowano żadnych zmian, jako badanie graniczne można przeprowadzić badanie rozrodczości, stosując badane stężenie 1 000 mg/kg i próbę kontrolną. Badanie graniczne stworzy możliwość wykazania, że nie istnieje żaden statystycznie istotny wpływ przy stężeniu granicznym. Należy zastosować osiem kontrprób w odniesieniu do badanej gleby i próby kontrolnej.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

39. Zdolność rozrodcza stanowi główny punkt końcowy (np. liczba wyprodukowanych młodych osobników w przeliczeniu na naczynie badawcze). W ramach analizy statystycznej, np. procedur ANOVA, porównuje się zabiegi za pomocą testu t-Studenta, testu Dunnetta lub testu Williamsa. 95 % przedziały ufności oblicza się w odniesieniu do poszczególnych średnich wartości zabiegów.
40. Liczba żywych osobników dorosłych w próbach kontrolnych, których nie poddano działaniu substancji, stanowi główne kryterium ważności i należy ją udokumentować. Podobnie jak w przypadku badania ustalającego zakres stężeń w sprawozdaniu końcowym należy również podać wszystkie pozostałe objawy szkodliwości.

 LC_x oraz EC_x

41. Wartości EC_x , w tym powiązane z nimi górne i dolne 95 % granice ufności w odniesieniu do danego parametru, oblicza się stosując odpowiednie metody statystyczne (np. funkcja logistyczna lub Weibulla, metoda Spearmana-Kärbera lub zwykła interpolacja). EC_x otrzymuje się przez wstawienie wartości odpowiadającej x % średniej wartości próby kontrolnej do utworzonego równania. Aby obliczyć EC_{50} lub dowolną inną wartość EC_x , należy zastosować analizę regresji w odniesieniu do kompletnego zestawu danych. LC_{50} zwykle oszacowuje się poprzez analizę probitową lub podobną, w której uwzględnia się dane dotyczące śmiertelności w rozkładzie dwumianowym.

NOEC/LOEC

42. Jeżeli analiza statystyczna ma na celu wyznaczenie NOEC/LOEC, niezbędne są dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń (poszczególne naczynia uznaje się za kontrpróby). Odpowiednie metody statystyczne należy stosować zgodnie z dokumentem OECD nr 54 »Aktualne podejście do statystycznej analizy danych ekotoksyczności: wytyczne stosowania« (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (9). Niekorzystny wpływ badanej substancji chemicznej w porównaniu z próbą kontrolną oblicza się na ogół, stosując test jednostronny dla $p \leq 0,05$.
43. Rozkład normalny i jednorodność wariancji można zbadać za pomocą odpowiedniego testu statystycznego, np. za pomocą testu Shapiro-Wilka i testu Levene'a, odpowiednio ($p \leq 0,05$). Można wykonać jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) i kolejne testy wielokrotnego porównywania. Testy wielokrotnego porównywania (np. test Dunnetta) lub regresyjne testy trendu (test Williamsa) mogą być stosowane w celu obliczenia, czy istnieje znacząca różnica ($p \leq 0,05$) między próbami kontrolnymi a różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej (wybór zalecanego testu zgodnie z dokumentem OECD nr 54 (9)). W przeciwnym razie NOEC i LOEC można określić za pomocą metod nieparametrycznych (np. za pomocą testu U-Bonferroniego zgodnie z testem trendu Holma lub Jonckheere'a-Terpstry).

Badanie graniczne

44. Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne (porównanie próby kontrolnej z jedną tylko próbą poddaną zabiegowi) i spełniono warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur badania (normalność, jednorodność), odpowiedzi metryczne można ocenić za pomocą testu t-Studenta. Jeżeli warunki te nie są spełnione, można zastosować test t-Studenta (test t-Welcha) dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, taki jak test U Manna-Whitneya.
45. Aby określić znaczące różnice między próbami kontrolnymi (próbą kontrolą i próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem), kontrpróby każdej próby kontrolnej mogą zostać poddane badaniu zgodnie z opisem dotyczącym badania granicznego. Jeżeli w wyniku tych badań nie zostaną wykryte znaczące różnice, wszystkie próby kontrolne i kontrpróby kontrolne z rozpuszczalnikiem mogą być połączone. W przeciwnym wypadku wszystkie zabiegi należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem.

Sprawozdanie z badania

46. Sprawozdanie z badania powinno zawierać co najmniej następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- nazwa badanej substancji chemicznej, partia, seria i numer CAS, stopień czystości;
- właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej (np. $\log K_{ow}$, rozpuszczalność w wodzie, prężność par, stała Henry'ego (H) i w miarę możliwości informacje o losach badanej substancji chemicznej w glebie), o ile są dostępne;
- należy określić postać użytkową badanej substancji chemicznej i dodatki, jeżeli badana substancja chemiczna nie jest chemicznie czysta;

Organizmy użyte do badań

- identyfikacja gatunku i dostawcy organizmów użytych do badania, opis warunków hodowli i przedział wiekowy organizmów użytych do badania;

Warunki badania

- opis planu doświadczalnego i procedury doświadczalnej;
- szczegóły dotyczące przygotowania gleby do badania; szczegółowa specyfikacja, jeżeli używa się naturalnej gleby (pochodzenie, historia, rozkład wielkości cząstek, pH, zawartość związków organicznych);
- pojemność wodna gleby;
- opis techniki stosowanej do wprowadzenia badanej substancji chemicznej do gleby;
- Warunki badania natężenie światła, czas trwania cykli światło-ciemność, temperatura;
- opis schematu żywienia, rodzaj i ilość pokarmu używanego w badaniu, terminy karmienia;
- pH i zawartość wody w glebie na początku i na końcu badania (próba kontrolna i każda próba poddana zabiegowi);
- szczegółowy opis metody wyjmowania i skuteczności wyjmowania;

Wyniki badania

- liczba osobników młodych oznaczonych w naczyniu badawczym na końcu badania;
- liczba osobników dorosłych i ich śmiertelność (%) w każdym naczyniu badawczym na końcu badania;
- opis wyraźnych objawów fizjologicznych lub patologicznych lub widocznych zmian w zachowaniu;
- wyniki otrzymane z wykorzystaniem badanej substancji chemicznej odniesienia;
- wartości NOEC/LOEC, LC_x w odniesieniu do śmiertelności oraz EC_x w odniesieniu do rozrodczości (głównie LC_{50} , LC_{10} , EC_{50} i EC_{10}) wraz z 95 % przedziałami ufności. Wykres dopasowanego modelu użytego do obliczania, równanie jego funkcji i jego parametry (zob. (9));

- wszystkie informacje i obserwacje pomocne w interpretacji wyników;
- moc rzeczywistego testu, jeżeli wykonano testowanie hipotez (9);
- odchylenia od procedur opisanych w niniejszej metodzie badawczej oraz wszelkie nietypowe zdarzenia, jakie miały miejsce podczas badania;
- ważność badania;
- w odniesieniu do NOEC, w przypadku oszacowania, minimalne wykrywalne różnice.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Wiles J.A. i Krogh P.H. (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. W: Handbook of soil invertebrate toxicity tests (red. H Løkke i CAM Van Gestel), s. 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. Nr 11267. Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna, Genewa.
- (3) Burges A. i Raw F. (red.) (1967) Soil Biology, Academic Press. Londyn.
- (4) Petersen H. i 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. 330 s. (ISBN 0-19-854084-1)
- (7) Ulber B. (1983) Einfluss von *Onychiurus fimeatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. W: New trends in soil Biology (Lebrun Ph., André H.M., De Medts A., Grégoire-Wibo, Wauthy G. (red.), Obrady VI międzynarodowego kolokwium w sprawie zoologii gleby, Louvain-la-neuve (Belgia), 30 sierpnia–2 września 1982 r., I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, s. 261–268.
- (8) Rozdział C.36 niniejszego załącznika, Badanie rozrodczości drapieżnych roztoczy (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) w glebie.
- (9) OECD (2006) Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Seria OECD dotycząca badań i oceny, nr 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paryż.
- (10) Scott-Fordsmand J.J. i Krogh P.H. (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Projekt ekologiczny nr 986, Miljøstyrelsen, s. 61, Duńskie Ministerstwo Środowiska.
- (11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Duńska Agencja Ochrony Środowiska, projekt ekologiczny nr 1256, s. 66.
- (12) Krogh PH., Johansen K. i 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. W: Soil Zoology (Kevan D.K. McE., red.). Butterworths, Londyn, s. 412–416.
- (15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomologists' Monthly Magazine* 96: 138–140.

Dodatek 1

Definicje

Następujące definicje mają zastosowanie do niniejszej metody badawczej (w tym badaniu wszystkie stężenia powodujące zmiany wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej w przeliczeniu na suchą masę badanej gleby):

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

NOEC (stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian) oznacza stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym nie obserwuje się żadnych szkodliwych zmian. W niniejszym badaniu stężenie odpowiadające NOEC nie ma statystycznie istotnego wpływu ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia przy porównaniu z próbą kontrolną.

LOEC (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany) oznacza najniższe stężenie badanej substancji chemicznej mające statystycznie istotny wpływ ($p < 0,05$) w danym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną.

EC_x (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływ na organizmy użyte do badań w danym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC₅₀ jest stężeniem, które według szacunków ma wpływ na punkt końcowy badania u 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

Dodatek 2

Główne działania i harmonogram przeprowadzania badania skoczogonków

Etapy badania można podsumować następująco:

Czas (dni)	Działanie
od – 23 do – 26	Przygotować synchroniczną hodowlę <i>F. fimetaria</i> .
– 14	Przygotować sztuczną glebę (mieszając suche składniki). Sprawdzić pH sztucznej gleby i odpowiednio je skorygować. Dokonać pomiaru maksymalnej pojemności wodnej gleby.
od – 9 do – 12	Przygotować synchroniczną hodowlę <i>F. candida</i> .
od – 2 do – 7	Wstępnie nawilżyć glebę.
– 1	Podzielić młode osobniki na partie. Przygotować roztwory podstawowe i dodać badaną substancję chemiczną, jeżeli wymagany jest rozpuszczalnik.
0	Przygotować roztwory podstawowe i dodać badaną substancję chemiczną, jeżeli ma ona postać stałą, jest rozpuszczalna w wodzie lub nanoszona na powierzchnię. Dokonać pomiaru pH gleby i zważyć pojemniki. Dodać pokarm. Wprowadzić skoczogonki.
14	Badanie ustalające zakres stężeń <i>F. fimetaria</i> : zakończyć badanie, wyjąć zwierzęta, dokonać pomiaru pH gleby i utraty wody (masa). Badanie ostateczne: dokonać pomiaru zawartości wilgoci, uzupełnić wodę i dodać 2–10 mg drożdży.
21	Badanie ostateczne <i>F. fimetaria</i> : zakończyć badanie, wyjąć zwierzęta, dokonać pomiaru pH gleby i utraty wody (masa). Badanie ustalające zakres stężeń <i>F. candida</i> : zakończyć badanie, wyjąć zwierzęta, dokonać pomiaru pH gleby i utraty wody (masa).
28	Badanie ostateczne <i>F. candida</i> : zakończyć badanie, wyjąć zwierzęta, dokonać pomiaru pH gleby i utraty wody (masa).

Dodatek 3

Wytyczne dotyczące hodowli i synchronizacji *F. fimetaria* i *F. candida*

Należy sprawdzić czas i okresy czasu trwania podane w niniejszej wytycznej w odniesieniu do każdego konkretnego szczepu skoczogonków, aby dobrany moment umożliwiał dostateczną synchronizację młodych osobników. Zasadniczo częstotliwość składania jaj po przeniesieniu dorosłych osobników do świeżego podłoża oraz wylęg jaj pomagają określić odpowiedni dzień na zbiór jaj i synchronicznych młodych osobników.

Zaleca się posiadanie stałej kultury wyjściowej składającej się z np. 50 pojemników/płytek Petriego. Kulturową wyjściową utrzymywać należy w dobrych warunkach żywieniowych, karmiąc raz w tygodniu, nawadniając i usuwając stary pokarm i padłe zwierzęta. Na skutek zbyt małej liczby skoczogonków w podłożu może nastąpić zahamowanie ich rozwoju w wyniku zwiększonego wzrostu grzybów. Jeżeli kulturę wyjściową zbyt często wykorzystuje się do produkcji jaj, może ona ulec zmęczeniu. Oznakami zmęczenia są martwe dorosłe osobniki i pleśń na podłożu. Pozostałe jajeczka pochodzące z produkcji synchronicznych zwierząt mogą zostać wykorzystane do odmlodzenia hodowli.

W przypadku synchronicznej kultury *F. fimetaria* samce odróżnia się od samic głównie rozmiarem. Samce są wyraźnie mniejsze od samic i poruszają się szybciej niż samice. Prawidłowa selekcja płci wymaga pewnej wprawy i może zostać potwierdzona mikroskopową identyfikacją okolic narządów płciowych (13).

1. Hodowla**1.a. Przygotowanie podłoża do hodowli**

Podłoże do hodowli składa się z gipsu modelarskiego (siarczanu wapnia) z aktywnym węglem drzewnym. Rozwiązanie to zapewnia wilgotność podłoża, przy czym węgiel pochłania gazy odlotowe i odchody (14) (15). W celu ułatwienia obserwacji skoczogonków można stosować różne postacie węgla. Na przykład sproszkowany węgiel wykorzystuje się w przypadku *F. candida* i *F. fimetaria* (co daje czarno-szary kolor gipsu modelarskiego):

Składniki podłoża:

- 20 ml węgla aktywnego
- 200 ml wody destylowanej
- 200 ml gipsu modelarskiego

albo

- 50 g sproszkowanego węgla aktywnego
- 260–300 ml wody destylowanej
- 400 g gipsu modelarskiego.

Przed użyciem należy pozostawić mieszaninę podłoża do ustalenia.

1.b. Hodowla

Skoczogonki są przechowywane w pojemnikach, takich jak płytki Petriego (90 mm × 13 mm), których dno pokryte jest warstwą podłoża z gipsu / węgla o grubości 0,5 cm. Hoduje się je w temperaturze 20 ± 1 °C, przy cyklu światła/ciemności wynoszącym 12/12 godzin (400–800 luksów). Pojemniki należy przez cały czas zwilżać zapewniając wilgotność względną powietrza wewnątrz pojemników na poziomie 100 %. Można to zapewnić dzięki obecności niezwiązanej wody w porowatym gipsie, nie dopuszczając jednak do powstania warstwy wody na powierzchni gipsu. Utracie wody można zapobiec poprzez zapewnienie wilgotnego powietrza otoczenia. Wszystkie martwe osobniki i pleśniejący pokarm należy usuwać z pojemników. W celu pobudzenia produkcji jajeczek konieczne jest przeniesienie dorosłych zwierząt na płytki Petriego ze świeżo przygotowanym podłożem z gipsu modelarskiego/węgla.

1.c. Źródło pokarmu

Zarówno w przypadku *F. candida*, jak i *F. fimetaria* jako jedyne źródło pokarmu stosuje się granulowane suszone drożdże piekarskie. Świeży pokarm jest podawany raz lub dwa razy w tygodniu, aby zapobiec pleśnieniu. Umieszcza się go bezpośrednio na gipsie modelarskim w małej kupce. Masę dodawanych drożdży piekarskich należy dostosować do wielkości populacji skoczogonków, przy czym zasadniczo wystarczająca ilość to 2–15 mg.

2. Synchronizacja

Badanie należy przeprowadzić z wykorzystaniem synchronicznych zwierząt w celu uzyskania jednorodnych zwierząt do badania w tym samym stadium larwalnym i tej samej wielkości. Ponadto synchronizacja umożliwia rozróżnienie samców i samic gatunku *F. fimetaria* w wieku od 3 tygodni wzwyż na podstawie dymorfizmu płciowego tj. różnic wielkości. Poniższa procedura stanowi propozycję sposobu uzyskania zsynchronizowanych zwierząt (praktyczne kroki są opcjonalne).

2.a. Synchronizacja

- Przygotować pojemniki, których dno pokryte jest warstwą podłoża z gipsu modelarskiego/węgla o grubości 0,5 cm.
- Przenieść 150–200 dorosłych osobników gatunku *F. fimetaria* i 50–100 gatunku *F. candida* z najlepszych 15–20 pojemników kultury wyjściowej z 4–8 tygodniowym podłożem do pojemników w celu złożenia jaj i podać 15 mg drożdży piekarskich. Unikać przechowywania młodych osobników razem z dorosłymi osobnikami, ponieważ obecność młodych osobników może spowodować zahamowanie procesu składania jaj.
- Przechowywać kulturę w temperaturze 20 ± 1 °C (średnia powinna wynosić 20 °C) w cyklu światła/ciemności wynoszącym 12/12 godzin (400–800 luksów). Zapewnić świeży pokarm oraz nasycenie powietrza wodą. Brak pokarmu może doprowadzić do wypróżniania się zwierząt na jajeczka, co może skutkować rozwojem grzybów, lub do zjedzenia w akcie kanibalizmu przez *F. candida* własnych jaj. Po 10 dniach zebrać ostrożnie jajeczka igłą lub szpatułką i przenieść na »bibułę do jajeczek« (mały kawałek bibuły filtracyjnej zanurzony w mieszaninie gipsu modelarskiego/szlamu węglowego), umieszczony w naczyniu ze świeżym podłożem z gipsu/węgla. W celu przyciągnięcia młodych osobników i nakłonienia ich do opuszczenia bibuły do jaj do podłoża dodaje się kilka ziaren drożdży. Ważne jest, aby bibuła do jajeczek i podłoże były wilgotne, bowiem w przeciwnym razie jajeczka ulegną dehydratacji. Inny sposób polega na usunięciu dorosłych zwierząt z pojemników służących do synchronizacji kultury po 2–3 dniach składania przez nie jaj.
- Po trzech dniach z większości jajeczek umieszczonych na bibule wyklują się młode osobniki, a niektóre z nich będzie można znaleźć pod bibułą.
- W celu zapewnienia jednakowego wieku młodych osobników bibułę do jajeczek z niewyklutymi jajeczkami usuwa się z płytki Petriego za pomocą szczypczyków. Młode osobniki, będące teraz w wieku 0–3, dni pozostają na płytce i są karmione drożdżami piekarskimi. Niewyklute jajeczka należy wyrzucić.
- Jaja i wyklute młode osobniki hoduje się w taki sam sposób jak osobniki dorosłe. W szczególności w przypadku gatunku *F. fimetaria* podjąć należy następujące środki: zapewnić wystarczającą ilość świeżego pokarmu, usuwać zapleśniałe pożywienie, po 1 tygodniu młode osobniki należy rozdzielić na nowe płytki Petriego, pod warunkiem że zagęszczenie wynosi powyżej 200 sztuk.

2.b. Postępowanie ze skoczogonkami w momencie rozpoczęcia badania

- *F. candida* w wieku 9–12 dni lub *F. fimetaria* w wieku 23–26 dni zbiera się np. przez zasysanie i wypuszcza do małego pojemnika z mokrym podłożem z gipsu/węgla, a ich stan fizyczny sprawdza się pod dwuokularowym mikroskopem (należy odrzucić ranne lub uszkodzone zwierzęta). Wszystkie etapy należy wykonać jednocześnie, przechowując skoczogonki w wilgotnej atmosferze, aby uniknąć stresu spowodowanego wysuszeniem, np. stosując mokre powierzchnie itp.
- Odwróć pojemnik do góry nogami i stuknąć weń w celu przerzucenia skoczogonków do gleby. Należy zneutralizować ładunki elektrostatyczne, w przeciwnym razie zwierzęta mogą po prostu unieść się w powietrze lub przylepić się do ścianki pojemnika badawczego i wyschnąć. W celu neutralizacji można wykorzystać jonizator lub mokrą szmatkę położoną pod pojemnikiem.
- Pokarm należy rozrzucić na całej powierzchni gleby, a nie położyć w postaci w jednej bryłki.

- Podczas transportu i w trakcie badania należy unikać uderzania lub innego fizycznego zakłócania spokoju w pojemnikach badawczych, ponieważ może to zwiększyć zagęszczenie gleby i utrudniać interakcje między skoczogonkami.

3. Inne gatunki skoczogonków

Do badania zgodnie z niniejszą metodą badawczą można wybrać inne gatunki skoczogonków, takie jak *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Przed wykorzystaniem innych gatunków spełniony musi zostać szereg warunków wstępnych:

- należy je jednoznacznie zidentyfikować;
 - należy przedstawić uzasadnienie wyboru gatunku;
 - należy zapewnić włączenie biologii reprodukcyjnej w etap badania, tak aby stanowiła potencjalny cel na etapie narażenia;
 - znana musi być historia życia: wiek osiągnięcia dojrzałości, długość rozwoju jaja i stadia larwalne poddawane narażeniu;
 - należy zapewnić optymalne warunki dla wzrostu i reprodukcji, stosując odpowiednie podłoże badawcze i źródło pokarmu;
 - zmienność powinna być odpowiednio niska, aby zapewnić precyzyjne i dokładne oszacowanie toksyczności.
-

Dodatek 4

Wyjęcie i liczenie zwierząt**1. Wyjęcie zwierząt można przeprowadzić dwoma metodami**

- 1.a. Pierwsza metoda: ekstraktor z kontrolowanym gradientem temperatury oparty na zasadzie działania aparatu MacFaydena (1). Ciepło wytwarzane przez element grzewczy znajdujący się w górnej części komory ekstrakcyjnej (regulowane przez termistor umieszczony na powierzchni próbki gleby). Temperatura w chłodzonym płynnym otoczeniu naczynia odbiorczego regulowana jest przez termistor umieszczony na powierzchni komory odbiorczej (umieszczonej poniżej warstwy gleby). Termistory podłączone są do programowalnej jednostki sterującej, która zwiększa temperaturę zgodnie z zaprogramowanym wcześniej harmonogramem. Zwierzęta zbierane są w chłodzonej komorze odbiorczej (2 °C) z dolną warstwą wykonaną z gipsu modelarskiego/węgla. Wyjmowanie rozpoczyna się w temperaturze 25 °C, a następnie temperatura jest automatycznie podwyższana o 5 °C co 12 godzin i całkowity czas trwania wyjmowania wynosi 48 godzin. Po 12 godzinach w temperaturze 40 °C wyjmowanie zwierząt zostaje zakończone.
- 1.b. Druga metoda: po eksperymentalnym okresie inkubacji liczbę obecnych młodych skoczogonków ocenia się za pomocą flotacji. W tym celu badanie wykonuje się w naczyniach o objętości około 250 ml. W końcowej fazie badania dodaje się około 200 ml wody destylowanej. Glebę łagodnie rozgarnia się za pomocą delikatnego pędzla, aby umożliwić skoczogonkom wypłynięcie na powierzchnię wody. Do wody dodać można trochę czarnego barwnika fotograficznego Kentmere w ilości około 0,5 ml, aby ułatwić liczenie przez zwiększenie kontrastu między wodą i białymi skoczogonkami. Barwnik nie jest toksyczny dla skoczogonków.

2. Liczenie:

Zwierzęta można liczyć wizualnie albo za pomocą mikroskopu świetlnego, stosując siatkę umieszczoną nad naczyniem, w którym pływają osobniki, albo fotografując powierzchnię każdego naczynia, a następnie licząc skoczogonki na powiększonych wydrukach lub na slajdach wyświetlanych z rzutnika. Obliczenia można również przeprowadzić, wykorzystując cyfrowe techniki przetwarzania obrazu (12). Wszystkie techniki powinny być zwalidowane.

Dodatek 5

Określenie maksymalnej pojemności wodnej gleby

Wykazano, że do określania maksymalnej pojemności wodnej gleby (WHC) odpowiednia jest następująca metoda. Została ona opisana w załączniku C normy ISO DIS 11268-2 (Jakość gleby – Wpływ zanieczyszczeń na dżdżownice (*Eisenia fetida*). Część 2: Określenie wpływu na reprodukcję).

Pobrać określoną ilość (np. 5 g) badanej gleby z podłoża, wykorzystując w tym celu odpowiedni przyrząd do pobierania próbek (wybierak ślimakowy itd.) Przykryć dno wybieraka mokrym kawałkiem bibuły filtracyjnej, a następnie umieścić wybierak na stelażu w łaźni wodnej. Wybierak należy stopniowo zanurzać aż do momentu, gdy poziom wody znajdzie się powyżej powierzchni gleby. Następnie należy zostawić go w wodzie na około trzy godziny. Ponieważ nie cała woda wchłonięta przez kapilary w glebie może zostać zatrzymana, należy umieścić wybierak na podłożu z wilgotnego drobno zmielonego piasku kwarcowego umieszczonego w przykrytym naczyniu (aby zapobiec wysychaniu) na dwie godziny w celu odsączenia próbki gleby. Próbkę należy następnie zważyć, wysuszyć do uzyskania stałej masy w temperaturze 105 °C. Pojemność wodną gleby (WHC) należy obliczać w następujący sposób:

$$\text{WHC (w \% suchej masy)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

gdzie:

S = podłoże nasycone wodą + masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej

T = tara (masa wybieraka + masa bibuły filtracyjnej)

D = sucha masa podłoża

*Dodatek 6***Określenie pH gleby**

Podana poniżej metoda określania pH gleby opiera się na opisie zawartym w normie ISO DIS 10390: Jakość gleby – Określenie pH.

Określoną ilość gleby suszy się w temperaturze pokojowej przez co najmniej 12 godzin. Następnie sporządza się zawiesinę gleby (zawierającą co najmniej 5 gramów gleby) w 1 M roztworze czystego chlorku potasu do analiz (KCl) lub 0,01 M roztworze czystego chlorku wapnia do analizy (CaCl_2) o objętości pięciokrotnie większej od objętości gleby. Otrzymaną zawiesinę wytrząsa się przez pięć minut, a następnie odstawia do osadzenia się na co najmniej 2 godziny, ale nie na dłużej niż 24 godziny. W fazie ciekłej pH mierzy się za pomocą pehametru, który jest kalibrowany przed każdym pomiarem przy użyciu odpowiedniego szeregu roztworów buforowych (np. pH 4,0 i 7,0).

**C.40. BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD-WODA W CYKLU ŻYCIA OCHOTKOWATYCH
Z WYKORZYSTANIEM WZBOGAONEJ WODY LUB WZBOGAONEGO OSADU**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 233 (2010 r.) w sprawie badań. Metoda ma na celu ocenę skutków trwającego przez całe życie narażenia słodkowodnych muchówek z gatunku *Chironomus* na działanie substancji chemicznych i obejmuje w całości pierwsze pokolenie (pokolenie P) oraz początek drugiego pokolenia (pokolenie F1). Stanowi ona rozszerzenie istniejących metod badawczych C.28 (1) lub C.27 (15), w których stosuje się, odpowiednio, scenariusz narażenia we wzbożonej wodzie lub scenariusz narażenia we wzbożonym osadzie. Uwzględnia się w niej protokoły badania toksyczności obowiązujące dla *Chironomus riparius* i *Chironomus dilutus* (zwanego wcześniej *C. tentans* (2)), które opracowano w Europie i Ameryce Płn. (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9), a następnie potwierdzono w badaniach międzylaboratoryjnych (1) (7) (10) (11) (12). Możliwe jest również zastosowanie innych dobrze udokumentowanych gatunków ochotkowatych, np. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Całkowity czas trwania narażenia wynosi około 44 dni w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a w przypadku *C. dilutus* – około 100 dni.
2. W niniejszej metodzie badawczej opisano zarówno scenariusz narażenia w wodzie, jak i w osadzie. Wybór odpowiedniego scenariusza narażenia zależy od zamierzonego zastosowania badania. Scenariusz narażenia w wodzie, polegający na wzbożeniu słupa wody, służy do symulacji znoszenia cieczy roboczej w przypadku pestycydów i obejmuje początkowe szczytowe stężenie w wodzie powierzchniowej. Wzbożenie wody jest również przydatne w odniesieniu do innych rodzajów narażenia (w tym wycieków chemicznych), z wyjątkiem procesów akumulacji w osadzie trwających dłużej niż okres badania. W tym przypadku, a także w przypadku gdy główną drogą przedostawania się pestycydów do akwenów wodnych jest ich spływanie, bardziej właściwy może być projekt badania wzbożonego osadu. Jeżeli przedmiotem zainteresowania są inne scenariusze narażenia, projekt badania można łatwo dostosować. Na przykład jeżeli dystrybucja badanej substancji chemicznej między fazę wodną i warstwę osadu nie jest przedmiotem zainteresowania oraz jeżeli należy zminimalizować adsorpcję przez osad, można rozważyć wykorzystanie zastępczego sztucznego osadu (np. piasku kwarcowego).
3. Substancje chemiczne, które wymagają badania na organizmach żyjących w osadach, mogą pozostawać w osadzie przez długi czas. W odniesieniu do organizmów żyjących w osadach możliwe są różne drogi narażenia. Względne znaczenie danej drogi narażenia i czas, w jakim każda z tych dróg przyczynia się do ogólnego efektu toksycznego, zależą od fizykochemicznych właściwości danej substancji chemicznej. W przypadku silnie adsorbujących substancji chemicznych lub w przypadku substancji chemicznych tworzących wiązania kowalencyjne z osadem znaczącą drogą narażenia może być przyjmowanie zanieczyszczonego pokarmu. Aby zapobiec niedoszacowaniu toksyczności wysokolipofilowych substancji chemicznych, można rozważyć dodanie pokarmu do osadu przed wprowadzeniem badanej substancji chemicznej (zob. pkt 31). W ten sposób możliwe jest uwzględnienie wszystkich dróg narażenia na każdym z etapów życia.
4. Mierzone punkty końcowe obejmują: całkowitą liczbę przepoczwarzonych osobników dorosłych (w odniesieniu do pierwszego i drugiego pokolenia), tempo rozwoju (dla pierwszego i drugiego pokolenia), proporcję płci w odniesieniu do w pełni przepoczwarzonych i żywych osobników dorosłych (pierwszego i drugiego pokolenia), liczbę sznurów jaj przypadającą na samicę (tylko pierwsze pokolenie) oraz płodność sznurów jaj (tylko pierwsze pokolenie).
5. Zdecydowanie zaleca się stosowanie osadu preparowanego. Osad preparowany posiada szereg zalet, których nie mają osady naturalne:
 - zmienność eksperymentalna jest ograniczona, ponieważ osad preparowany stanowi odtwarzalną »standardową matrycę« i wyeliminowana zostaje potrzeba znalezienia źródła niezanieczyszczonego, czystego osadu;
 - badania można rozpocząć w każdej chwili, unikając zmienności sezonowej badanego osadu, i nie ma konieczności poddawania osadu wstępnej obróbce w celu usunięcia rodzimej fauny;
 - mniejsze koszty w porównaniu z pobieraniem w terenie dostatecznych ilości osadu dla potrzeb rutynowych badań.
 - zastosowanie osadu preparowanego umożliwia porównanie toksyczności między badaniami oraz stosowną klasyfikację substancji chemicznych (3).
6. Zastosowane definicje są zamieszczone w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

7. Larwy ochotkowatych w pierwszym stadium larwalnym poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej o różnym stopniu stężenia w układzie osad-woda. Badanie rozpoczyna się od umieszczenia larw w pierwszym stadium larwalnym (pierwsze pokolenie) w zlewkach badawczych zawierających wzbogacony osad albo badaną substancję chemiczną dodaje się do wody po dodaniu larw. Ocenia się wylęg ochotkowatych, czas do wylęgu oraz proporcję płci w odniesieniu do w pełni przepoczwarczonych i żywych muchówek. Przepoczwarczone osobniki dorosłe przenosi się do klatek hodowlanych w celu ułatwienie rojenia, godów i składania jaj. Ocenie podlega liczba sznurów jaj i ich płodność. Z tych sznurów jaj pozyskuje się larwy w pierwszym stadium larwalnym z drugiego pokolenia. Larwy umieszcza się w świeżo przygotowanych zlewkach badawczych (procedura wzbogacania taka sama jak w przypadku pierwszego pokolenia) w celu określenia żywotności drugiego pokolenia poprzez ocenę wylęgu, czasu do wylęgu oraz proporcji płci w odniesieniu do w pełni przepoczwarczonych i żywych muchówek (schemat badania cyklu życia zamieszczony jest w dodatku 5). Wszystkie dane analizuje się przy użyciu modelu regresji w celu oszacowania stężenia, które spowodowałoby X % zmniejszenie w odniesieniu do danego punktu końcowego albo w drodze testowania hipotez w celu oznaczenia stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC). To ostatnie wymaga porównania reakcji na zabieg z reakcjami odpowiednich prób kontrolnych za pomocą badań statystycznych. Należy zauważyć, że w przypadku scenariusza z zastosowaniem wzbogaconej wody w odniesieniu do szybko rozkładających się substancji chemicznych na późniejszych etapach życia każdego pokolenia (np. stadium poczwarki) zwierzęta mogą być narażone na znacznie niższy poziom stężenia w wodzie nadosadowej niż larwy w pierwszym stadium rozwoju larwalnego. Jeżeli stanowi to problem, a w przypadku każdego stadium konieczne jest zastosowanie porównywalnego poziomu narażenia, można rozważyć następujące zmiany metody badawczej:

- równoległe serie z wzbogacaniem na różnych etapach życia lub
- powtarzane wzbogacanie (lub odnawianie wody nadosadowej) w układzie badawczym w ciągu obydwu faz badania (pierwsze i drugie pokolenie), przy czym odstępy czasowe między wzbogacaniem (wymianą) powinny być dostosowane do charakterystyki losów badanej substancji chemicznej.

Zmiany takie są możliwe tylko w przypadku scenariusza ze wzbogaconą wodą, a nie ze wzbogaconym osadem.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

8. Należy znać rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wodzie, prężność par i $\log K_{ow}$ oraz ilość substancji, która przedostała się do osadu oraz jej stabilność w wodzie i osadzie, uzyskane w wyniku pomiarów lub obliczeń. Powinna być dostępna wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego badanej substancji chemicznej w osadzie, wodzie porowej i warstwie wody nadosadowej ze znaną i udokumentowaną dokładnością oraz granicą wykrywalności. Użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny i czystość badanej substancji chemicznej. Przydatne są także dane dotyczące chemicznych losów badanej substancji chemicznej w środowisku (np. jej rozpraszanie się, rozkład abiotyczny i biotyczny itd.). Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji chemicznych o własnościach fizykochemicznych utrudniających ich badanie podano w pozycji (16) bibliografii.

SUBSTANCJE CHEMICZNE ODNIESIENIA

9. Można okresowo badać chemiczne substancje odniesienia, aby upewnić się, czy wrażliwość populacji laboratoryjnej nie uległa zmianie. W przypadku rozwiłtek wystarczające byłoby przeprowadzenie 48-godzinnego badania toksyczności ostrej (zgodnie z 17). Dopóki jednak nie będą dostępne wytyczne dotyczące zweryfikowanego badania toksyczności ostrej, można rozważyć zastosowanie badania toksyczności przewlekłej zgodnie z rozdziałem C.28 niniejszego załącznika. Przykłady toksycznych substancji odniesienia stosowanych z powodzeniem w badaniach międzylaboratoryjnych i badaniach weryfikacyjnych to: lindan, trifluralina, pentachlorofenol, chlorek kadmu i chlorek potasu. (1) (3) (6) (7) (18).

WAŻNOŚĆ BADANIA

10. Aby badanie było ważne, muszą zostać spełnione następujące warunki:
- średni odsetek wylęgniętych osobników dorosłych w próbie kontrolnej poddanej zabiegowi powinien wynosić co najmniej 70 % na koniec okresu narażenia dla obydwu pokoleń (1) (7);
 - w odniesieniu do *C. riparius* i *C. yoshimatsui* 85 % wszystkich przepoczwarczonych dorosłych muchówek z próby kontrolnej poddanej zabiegowi w obydwu pokoleniach powinno pojawić się w okresie 12–23 dni po wprowadzeniu do naczyń larw w pierwszym stadium larwalnym; w odniesieniu do *C. dilutus* dopuszcza się okres 20–65 dni;

- średnia proporcja płci wśród w pełni przepoczwarzonych i żywych osobników dorosłych (jako odsetek samic lub samców) w próbie kontrolnej poddanej zabiegowi w obydwu pokoleniach powinna wynosić co najmniej 0,4, ale nie powinna przekraczać 0,6;
- w odniesieniu do każdej klatki hodowlanej liczba sznurów jaj w próbach kontrolnych pierwszego pokolenia powinna wynosić co najmniej 0,6 na samicę dodaną do klatki hodowlanej;
- w odniesieniu do każdej klatki hodowlanej odsetek sznurów zapłodnionych jaj w próbach kontrolnych pierwszego pokolenia powinien wynosić co najmniej 0,6;
- na końcu okresu narażenia obydwu generacji należy zmierzyć wartość pH oraz stężenie rozpuszczonego tlenu w każdym naczyniu. Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem (ASV ⁽¹⁾), a wartość pH w warstwie wody nadosadowej powinna we wszystkich naczyniach badawczych mieścić się w przedziale 6–9;
- temperatura wody nie powinna różnić się o więcej niż $\pm 1,0$ °C.

OPIS METODY

Naczynia badawcze i klatki hodowlane

11. Larwy poddaje się narażeniu na działanie danej substancji w szklanych zlewkach o pojemności 600 ml i średnicy około 8,5 cm (zob. dodatek 5). Inne naczynia także mogą nadawać się do badań, powinny jednak zapewniać odpowiednią grubość warstwy osadu i wody nadosadowej. Powierzchnia osadu powinna być wystarczająca, by zapewnić 2–3 cm₂ na larwę. Stosunek grubości warstwy osadu do warstwy wody nadosadowej powinien wynosić około 1:4. Należy zastosować klatki hodowlane (minimum 30 cm dla wszystkich trzech wymiarów) z siatką (rozmiar oczek około 1 mm) na górze i należy wykorzystać co najmniej jedną stronę klatki (zob. dodatek 5). W każdej klatce umieszcza się krystalizator o pojemności 2 l do składnia jaj, zawierający wodę badawczą i osad. Również w przypadku krystalizatora stosunek grubości warstwy osadu do warstwy wody nadosadowej powinien wynosić około 1:4. Po zebraniu z krystalizatorów sznurów jaj umieszcza się je na 12-dółkowej mikropłytkie (jeden sznur na dołek zawierający co najmniej 2,5 ml wody ze wzbogaconego krystalizatora), następnie płytki przykrywa się pokrywą, aby zapobiec znacznemu parowaniu. Wykorzystać można również inne naczynia nadające się do umieszczenia w nich sznurów jaj. Z wyjątkiem mikropłytek wszystkie naczynia badawcze i inne przyrządy mające kontakt z układem badawczym powinny być w całości wykonane ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału (np. politetrafluoroetyleny).

Wybór gatunków

12. Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu powinien być w miarę możliwości *Chironomus riparius*. Można także użyć *C. yoshimatsui*. *C. dilutus* jest także odpowiedni, ale jest trudniejszy w hodowli i wymaga dłuższego okresu badania. Szczegóły dotyczące metod hodowli w odniesieniu do *C. riparius* podano w dodatku 2. Informacje dotyczące warunków hodowli są także dostępne dla *C. dilutus* (5) i *C. yoshimatsui* (14). Przed przeprowadzeniem badania należy potwierdzić identyfikację gatunków, ale nie jest to wymagane przed każdym badaniem, jeśli organizmy pochodzą z hodowli wewnątrzlaboratoryjnej.

Osad

13. W miarę możliwości należy stosować osad preparowany (zwany także osadem regenerowanym, sztucznym lub syntetycznym). Jeśli jednak korzysta się z osadu naturalnego, należy go opisać (podając co najmniej pH, zawartość węgla organicznego, zaleca się także określenie innych parametrów, takich jak stosunek C/N i granulometrię). Osad taki powinien być wolny od zanieczyszczeń i innych organizmów, które mogłyby konkutować z ochotkowatymi lub zjadać ich larwy. Zaleca się również, aby osad przed badaniem był przez siedem dni kondycjonowany w warunkach badania. Zaleca się zastosowanie następującego osadu preparowanego (1) (20) (21), jak opisano w (1):
 - a. 4–5 % torfu (w przeliczeniu na suchą masę); pH jak najbardziej zbliżone do 5,5–6,0; ważne jest, by stosować torf w postaci sproszkowanej, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm) i suszony wyłącznie powietrzem;
 - b. 20 % gliny kaolinowej (w przeliczeniu na suchą masę) (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);

⁽¹⁾ W temperaturze 20 °C przy zwykłym ciśnieniu atmosferycznym wartość nasycenia powietrzem w wodach słodkich równa się 9,1 mg/l (60 % równa się 5,46 mg/l).

- c. 75–76 % piasku kwarcowego (w przeliczeniu na suchą masę) (powinien przeważać drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek ma wielkość 50–200 µm);
 - d. w celu uzyskania wilgotności końcowej mieszaniny na poziomie od 30–50 % dodaje się wodę dejonizowaną;
 - e. w celu skorygowania pH końcowej mieszaniny osadu do wartości $7,0 \pm 0,5$ dodaje się do niej chemicznie czysty węglan wapnia (CaCO_3);
 - f. zawartość węgla organicznego w końcowej mieszaninie powinna wynosić 2 % ($\pm 0,5$ %) i należy ją skorygować przy użyciu odpowiednich ilości torfu i piasku, zgodnie z lit. a) i c).
14. Źródło torfu, glinki kaolinowej i piasku powinno być znane. Składniki osadu należy sprawdzić pod kątem zanieczyszczenia chemicznego (np. metalami ciężkimi, związkami chloroorganicznymi, związkami fosforoorganicznymi). W dodatku 3 podano przykładowy sposób przygotowania osadu preparowanego. Dopuszczalne jest także mieszanie suchych składników, o ile zostanie wykazane, że po dodaniu warstwy wody nadosadowej składniki osadu nie rozdzielają się (np. nie unoszą się cząstki torfu) oraz że torf lub osad został poddany dostatecznemu kondycjonowaniu.

Woda

15. Jako wodę do badania można stosować każdy rodzaj wody, której charakterystyka zgodna jest z charakterystyką chemiczną wody rozcieńczającej, jak opisano w dodatkach 2 i 4. Do hodowli ochotkowatych i do badania może służyć każdy odpowiedni rodzaj wody, np. woda naturalna (powierzchniowa lub gruntowa), woda regenerowana (zob. dodatek 2) lub odchlorowana woda wodociągowa, pod warunkiem że ochotkowate przeżyją w niej przez okres hodowli i badania bez wykazywania oznak stresu. Na początku badania wartość pH wody użytej do badania powinna wynosić 6–9, a twardość ogółem wody w przeliczeniu na CaCO_3 nie powinna być wyższa niż 400 mg/l. Jeżeli jednak zachodzi podejrzenie interakcji jonów powodujące twardość wody i badanej substancji chemicznej, należy użyć wody o mniejszej twardości (zatem nie należy w takim przypadku stosować roztworu Elendta M4). Przez okres całego badania należy stosować ten sam rodzaj wody. Cechy jakości wody wymienione w dodatku 4 należy mierzyć co najmniej dwa razy w roku lub każdorazowo kiedy zachodzi podejrzenie, że mogły ulec znacznej zmianie.

Roztwory podstawowe – wzbogacona woda

16. a. Badane stężenia oblicza się na podstawie stężeń w słupie wody, tj. w warstwie wody nadosadowej. Roztwory do badań o wybranych stężeniach są zwykle sporządzane przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zaleca się przygotować roztwory podstawowe, rozpuszczając badaną substancję chemiczną w wodzie badawczej. W niektórych przypadkach wymagane może być stosowanie rozpuszczalników lub środków dyspergujących w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Przykładami odpowiednich rozpuszczalników są aceton, eter monoetylowy glikolu etylenowego, eter dimetylowy glikolu etylenowego, dimetyloformamid i glikol trójetylenowy. Dopuszczalne środki dyspergujące to Cremophor RH40, Tween 80, metyloceluloza 0,01 % i HCO-40. Stężenie środka rozpuszczającego w podłożu do badania końcowego powinno być minimalne (tj. $\leq 0,1$ ml/l) i jednakowe we wszystkich badaniach. W przypadku zastosowania środka rozpuszczającego nie powinien on mieć żadnego znaczącego wpływu na przeżycie, co należy wykazać w próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem w porównaniu z ujemną próbą kontrolną (woda). Należy jednak dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć stosowania takich substancji.

Roztwory podstawowe – wzbogacony osad

16. b. Wzbogacone osady o wybranym stężeniu substancji badanej są zwykle przygotowywane przez dodanie roztworu tej substancji chemicznej bezpośrednio do osadu. Roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w dejonizowanej wodzie miesza się z osadem preparowanym z użyciem rozdrabniacza, mieszalnika lub ręcznie. Jeżeli badana substancja chemiczna słabo rozpuszcza się w wodzie, można ją rozpuścić w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, w jak najmniejszej jego ilości (np. w heksanie, acetonie lub chloroformie). Roztwór taki następnie miesza się z drobnym piaskiem kwarcowym w ilości 10 gramów na każde naczynie badawcze. Pozostawia się go do całkowitego odparowania rozpuszczalnika, aby został całkowicie usunięty z piasku; następnie piasek miesza się z odpowiednią ilością osadu. Do rozpuszczenia, dyspergowania lub emulsyfikacji badanej substancji chemicznej mogą być użyte jedynie łatwo ulatniające się czynniki. Należy mieć na uwadze, że przy preparowaniu osadu należy uwzględnić piasek

zawarty w mieszaninie badanej substancji chemicznej i piasku (czyli osad należy przygotować z mniejszą ilością piasku). Należy dopilnować, by badana substancja chemiczna dodana do osadu została w nim starannie i równomiernie rozprowadzona. W razie konieczności dla określenia jednorodności mieszaniny podpróbki należy poddać analizie.

PROJEKT BADANIA

17. Projekt badania obejmuje dobór liczby i rozstawienie badanych stężeń, dobór liczby naczyń zawierających każde badane stężenie, liczby larw na jedno naczynie, liczby krystalizatorów i klatek hodowlanych. Poniżej przedstawiono opisy projektów dla oszacowania wartości EC_x , NOEC i badania granicznego.

Projekt analizy regresyjnej

18. Należy objąć badaniem stężenie efektywne (EC_x) i zakres stężeń, które są przedmiotem zainteresowania, tak aby punkt końcowy nie był ekstrapolowany poza zebrane dane. Należy unikać ekstrapolowania wyników znacznie poniżej najniższego lub powyżej najwyższego stężenia. Wstępne badanie ustalające zakres zgodne z metodami badań C.27 lub C.28 może być pomocne przy wyborze odpowiedniego zakresu badanych stężeń.
19. W przypadku podejścia opartego na EC_x wymaganych jest co najmniej pięć stężeń, a dla każdego stężenia – osiem kontrprób. W przypadku każdego stężenia należy zastosować dwie klatki hodowlane (A i B). Osiem kontrprób dzieli się na dwie grupy po cztery kontrpróby każda na potrzeby każdej klatki hodowlanej. To połączenie kontrprób jest konieczne ze względu na liczbę muchówek w klatce niezbędnych do przeprowadzenia prawidłowej oceny rozmnażania. Drugie pokolenie ma jednak ponownie osiem kontrprób, które powstają z narażonych populacji w klatkach hodowlanych. Współczynnik rozstawienia stężeń nie powinien przekraczać dwóch (z wyjątkiem przypadków, gdy krzywa dawka–efekt ma łagodny przebieg). Liczbę kontrprób dla każdego zabiegu można zmniejszyć do sześciu (trzy na każdą hodowlę), jeśli zwiększy się liczbę badanych stężeń dających różne reakcje. Zwiększanie liczby kontrprób lub zmniejszanie rozstawienia badanych stężeń zwykle prowadzi do zawężenia przedziałów ufności wokół wartości EC_x .

Projekt dotyczący oszacowania NOEC

20. W celu oznaczenia wartości NOEC należy zastosować pięć stężeń substancji badanej z co najmniej ośmioma kontrpróbami (4 dla każdej klatki hodowlanej, A i B), a rozstawienie stężeń nie powinno przekraczać dwóch. Liczba kontrprób powinna być na tyle duża, by zapewnić odpowiednią moc statystyczną dla wykrycia 20 % różnicy w stosunku do próby kontrolnej przy poziomie istotności wynoszącym 5 % ($\alpha = 0,05$). W odniesieniu do tempa rozwoju, potencjału reprodukcyjnego i płodności zwykle stosuje się analizę wariancji (ANOVA), a następnie test Dunnetta i test Williamsa (22–25). W odniesieniu do wskaźnika wylęgu i proporcji płci można zastosować test Cochran-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela.

Badanie graniczne

21. Jeśli w opcjonalnym wstępnym badaniu ustalającym zakres nie zaobserwowano żadnych zmian aż do poziomu maksymalnego stężenia, można przeprowadzić badanie graniczne (jedno badane stężenie i jedna próba kontrolna). Badanie graniczne ma na celu wskazanie, że toksyczne skutki badanej substancji chemicznej występują przy wyższych poziomach stężenia niż zbadane stężenie graniczne. W przypadku wody sugeruje się 100 mg/l, a w przypadku osadu 1 000 mg/kg (suchej masy). Zazwyczaj niezbędne jest co najmniej osiem kontrprób zarówno na potrzeby zabiegu, jak i próby kontrolnej. Należy wykazać odpowiednią moc statystyczną, która pozwala wykryć 20 % różnicę w porównaniu z próbą kontrolną przy 5 % poziomie istotności ($\alpha = 0,05$). Przy odpowiedziach metrycznych (np. tempo rozwoju) odpowiednią metodą statystyczną jest test t-Studenta, jeżeli dane spełniają warunki tego testu (normalność rozkładu zmiennych, jednorodność wariancji). Jeśli te warunki nie są spełnione, można zastosować test t-Studenta dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, np. test Manna-Whitneya-Wilcoxona. W przypadku wskaźnika wylęgu odpowiedni jest test dokładny Fishera.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji*Przygotowanie układu woda-osad (wzbogacanie wody)*

22. a) Do każdego z naczyń badawczych i krystalizatorów wprowadza się spreparowany osad (zob. pkt 13–14 i dodatek 3), tak aby powstała warstwa o grubości co najmniej 1,5 cm (w przypadku krystalizatora może ona być nieco mniejsza), ale nie większej niż 3 cm. Aby stosunek grubości warstwy osadu do warstwy wody nie przekraczał 1:4, należy dodać wody (zob. pkt 15). Po przygotowaniu naczyń badawczych układ osad-woda należy delikatnie napowietrzać przez około siedem dni przed dodaniem larw w pierwszym stadium larwalnym pierwszego i drugiego pokolenia (zob. pkt 14 oraz dodatek 3). Układ osad-woda złożony z krystalizatorów nie jest napowietrzany podczas badania, ponieważ nie ma potrzeby wspomagania przeżycia larw (przed wylęgiem sznury jaj zostały już zebrane). Podczas dodawania wody do badania, w celu uzyskania warstwy wody nadosadowej i aby uniknąć oddzielenia składników osadu i ponownego zawieszenia w wodzie drobnoziarnistego materiału, osad można nakryć krążkiem z tworzywa sztucznego. Następnie krążek należy bezzwłocznie usunąć. Właściwe może być także zastosowanie innych przyrządów.

Przygotowanie układu woda-osad (wzbogacony osad)

22. b) Wzbogacony osad sporządzony zgodnie z pkt 16b umieszcza się w naczyniach i krystalizatorze, a następnie dodaje się wodę nadosadową, aby uzyskać stosunek objętości osadu do wody równy 1:4. Grubość warstwy osadu powinna mieścić się w przedziale 1,5–3 cm (w przypadku krystalizatora może być nieco mniejsza). Podczas dodawania wody do badania, w celu uzyskania warstwy wody nadosadowej i aby uniknąć oddzielenia składników osadu i ponownego zawieszenia w wodzie drobnoziarnistego materiału, osad można nakryć krążkiem z tworzywa sztucznego, a następnie krążek bezzwłocznie usunąć. Właściwe może być także zastosowanie innych przyrządów. Po przygotowaniu wzbogaconego osadu z wodą nadosadową należałoby umożliwić rozdzielenie badanej substancji chemicznej między fazę wodną i osad (4) (5) (7) (18). W miarę możliwości powinno się to odbywać w takich samych warunkach temperatury i napowietrzenia, jakie zastosowano na potrzeby badania. Okres ustalania stanu równowagi zależy od osadu i substancji chemicznej i może trwać kilka godzin lub kilka dni, a w rzadkich przypadkach do pięciu tygodni. Ponieważ w tym czasie wiele substancji chemicznych może ulec rozkładowi, nie oczekuje się uzyskania stanu równowagi, ale zaleca się stosowanie 48-godzinnego okresu wyrównania stężeń. Jeżeli jednak połowiczny czas rozpadu substancji chemicznej w osadzie jest długi (zob. pkt 8), czas wyrównania stężeń można przedłużyć. Na zakończenie tego dodatkowego okresu wyrównywania stężeń należy zmierzyć stężenie badanej substancji chemicznej w wodzie nadosadowej, wodzie porowej i w osadzie co najmniej przy najwyższym stężeniu i przy niższym stężeniu (zob. pkt 38). Takie oznaczenia analityczne badanej substancji chemicznej umożliwiają obliczenie bilansu masy i wyrażenie wyników w oparciu o zmierzone stężenia.
23. Naczynia badawcze należy przykryć (np. szklanymi płytkami). W razie konieczności w czasie badania poziom wody można uzupełnić do pierwotnej objętości, aby wyrównać brak spowodowany parowaniem. Należy do tego celu użyć wody destylowanej lub wody dejonizowanej, aby zapobiec odkładaniu się soli. Krystalizatory w kłatkach hodowlanych nie są przykrywane i mogą, choć nie muszą, być uzupełniane wodą, aby wyrównać straty wody w trakcie badania, ponieważ sznury jaj są w kontakcie z wodą w przybliżeniu tylko przez jeden dzień, a naczyni używa się tylko podczas krótkiej fazy badania.

Dodanie organizmów użytych do badania

24. Na cztery do pięciu dni przed dodaniem larw w pierwszym stadium larwalnym pierwszego pokolenia pakiety jaj należy wyjąć z hodowli i umieścić w małych naczyniach w pożywce hodowlanej. Można w tym celu zastosować pożywkę wykorzystywaną w hodowli wyjściowej lub świeżo przygotowaną pożywkę. W obu przypadkach do pożywki hodowlanej należy dodać niewielką ilość pokarmu, np. kilka kropel filtratu z drobno zmielonej zawiesiny pokarmu w płatkach dla ryb (zob. dodatek 2). Należy wykorzystać wyłącznie świeżo złożone pakiety jaj. Wylęg larw zaczyna się przeważnie kilka dni po złożeniu jaj (2–3 dni w przypadku *C. riparius* w temperaturze 20 °C oraz 1–4 dni w przypadku *C. dilutus* w temperaturze 23 °C i *C. yoshimatsui* w temperaturze 25 °C), a wzrost larw następuje w czterech stadiach larwalnych, z których każde trwa 4–8 dni. Do badania należy użyć larw w pierwszym stadium larwalnym (maksymalnie 48 h po wylęgu). Stadium larwalne larw można sprawdzić, mierząc szerokości puszki głowowej (7).

25. Dwadzieścia larw w pierwszym stadium larwalnym z pierwszego pokolenia przydziela się losowo do każdego naczynia doświadczalnego zawierającego układ osad-woda za pomocą tępo zakończonej pipety. Po umieszczeniu larw w naczyniach należy wstrzymać napowietrzanie wody i nie uruchamiać go przez dobę po ich wprowadzeniu (zob. pkt 32). Zgodnie z zastosowanym projektem badania (zob. pkt 19 i 20) w przypadku podejścia EC_x należy użyć co najmniej 120 larw na stężenie, a w przypadku podejścia NOEC – 160 larw (8 kontrprób na stężenie). W projekcie ze wzbogaconym osadem narażenie zaczyna się w momencie dodania larw.

Wzbogacenie wody nadosadowej

26. Po upływie dwudziestu czterech godzin od dodania larw w pierwszym stadium rozwoju larwalnego z pierwszego pokolenia wodę nadosadową wzbogaca się badaną substancją chemiczną i ponownie uruchamia delikatne napowietrzanie (ewentualne zmiany w projekcie badania zostały opisane w pkt 7). Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej wprowadza się w małych ilościach pod powierzchnię wody za pomocą pipety. Wodę nadosadową należy następnie ostrożnie zamieszać, tak aby nie poruszyć osadu. W projekcie ze wzbogaconą wodą narażenie zaczyna się w momencie wzbogacenia wody (tj. po upływie jednego dnia od dodania larw).

Zbieranie przepoczwarczonych osobników dorosłych

27. Przepoczwarczone muchówki z pierwszego pokolenia zbiera się co najmniej raz, a najlepiej dwa razy dziennie (zob. pkt 36) z naczyń doświadczalnych za pomocą aspiratora, wentylatora wyciągowego lub podobnego urządzenia (zob. dodatek 5). Należy zachować szczególną uwagę, aby nie uszkodzić dorosłych osobników. Zebrane muchówki z czterech naczyń badawczych z jednego zabiegu uwalnia się do klatki hodowlanej, do której zostały uprzednio przypisane. W dniu pierwszego wylęgu (samców) do krystalizatora wprowadza się pod powierzchnię wody małą ilość roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej za pomocą pipety (projekt ze wzbogaconą wodą). Wodę nadosadową należy następnie ostrożnie zamieszać, tak aby nie poruszyć osadu. Stężenie badanej substancji chemicznej w krystalizatorze jest nominalnie takie samo jak w naczyniach zabiegowych przypisanych do danej klatki hodowlanej. W przypadku projektu ze wzbogaconym osadem krystalizatory przygotowuje się w przybliżeniu w 11. dniu po rozpoczęciu narażenia (tj. dodaniu larw z pierwszego pokolenia), aby stabilizowały się przez około 48 godzin przed wytworzeniem pierwszych sznurów jaj.
28. Sznury jaj wybiera się z krystalizatora w klatce hodowlanej za pomocą pęsety lub tępo zakończonej pipety. Każdy sznur jaj umieszcza się w naczyniu zawierającym podłoże hodowlane z krystalizatora, z którego został on pobrany (np. w dołku mikropłytki 12-dołkowej z co najmniej 2,5 ml pożywki). Naczynia ze sznurami jaj przykrywa się pokrywą w celu uniknięcia znacznego parowania. Sznury jaj przechowuje się do celów obserwacji przez co najmniej sześć dni od ich powstania w celu ich sklasyfikowania jako zapłodnione lub niezapłodnione.

Aby zapoczątkować drugie pokolenie, z każdej klatki hodowlanej wybiera się co najmniej trzy, a najlepiej sześć sznurów zapłodnionych jaj i pozostawia do wylęgnięcia z pewną ilością pokarmu. Te sznury jaj powinny powstać w szczytowym momencie okresu składania jaj, co zwykle następuje około 19. dnia badania w próbach kontrolnych. Najlepiej byłoby, gdyby drugie pokolenie ze wszystkich zabiegów było zapoczątkowane tego samego dnia, czasami może się to jednak okazać niemożliwe ze względu na wpływ substancji chemicznej na rozwój larw. W takim przypadku stosowanie wyższych stężeń można zapoczątkować później niż zabiegi z niższymi dawkami i z próbą kontrolną (z rozpuszczalnikiem).

29. a) W projekcie ze wzbogaconą wodą układ osad-woda dla drugiego pokolenia przygotowuje się, wzbogacając warstwę wody nadosadowej substancją chemiczną na około 1 godzinę przed dodaniem larw w pierwszym stadium larwalnym do naczyń badawczych. Roztwory badanej substancji chemicznej wprowadza się w małych ilościach pod powierzchnię wody za pomocą pipety. Wodę nadosadową należy następnie ostrożnie zamieszać, tak aby nie poruszyć osadu. Po wzbogaceniu zapewnia się delikatne napowietrzanie.
29. b) W projekcie ze wzbogaconym osadem naczynia poddawane narażeniu, zawierające układ osad-woda dla drugiego pokolenia, przygotowuje się w taki sam sposób jak dla pierwszego pokolenia.
30. Dwadzieścia larw w pierwszym stadium larwalnym (maksymalnie 48 h po wykluciu) z drugiego pokolenia przydziela się losowo do każdego naczynia badawczego zawierającego wzbogacony układ osad-woda za pomocą tępo zakończonej pipety. Po wprowadzeniu larw w pierwszym stadium larwalnym do naczyń należy

wstrzymać napowietrzanie wody i nie uruchamiać go przez dobę od ich wprowadzenia. Zgodnie z zastosowanym projektem badania (zob. pkt 19 i 20) w przypadku podejścia EC_x należy użyć co najmniej 120 larw na stężenie (6 kontrprób na stężenie), a w przypadku podejścia NOEC – 160 larw (8 kontrprób na stężenie).

Pokarm

31. Larwy w naczyniach badawczych należy karmić w miarę możliwości codziennie lub co najmniej trzy razy w tygodniu. Do karmienia młodych larw przez pierwsze 10 dni rozwoju nadaje się pokarm dla ryb (zawieszona w wodzie lub drobno zmielony pokarm, np. Tetra-Min lub Tetra-Phyll; zob. szczegółowe informacje w dodatku 2) w ilości 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg w przypadku *C. yoshimatsui*) na larwę dziennie. Starsze larwy mogą potrzebować nieco więcej pokarmu: 0,5–1,0 mg na larwę dziennie powinno stanowić wystarczającą ilość przez pozostałą część badania. Jeśli zaobserwuje się wzrost grzybów lub śmiertelność w próbach kontrolnych, należy wówczas we wszystkich zabiegach i próbach kontrolnych ograniczyć dawki pokarmu. Jeśli nie można powstrzymać rozwoju grzybów, należy powtórzyć badanie.

Znaczenie toksykologiczne narażenia drogą pokarmową jest ogólnie wyższe w przypadku substancji chemicznych o wysokim powinowactwie do węgla organicznego lub substancji chemicznych tworzących wiązania kowalencyjne z osadem. W związku z tym przy badaniu substancji chemicznych o takich właściwościach ilość pokarmu niezbędną do zapewnienia przeżycia i naturalnego wzrostu larw można dodać do osadu preparowanego przed okresem stabilizacji, w zależności od zapotrzebowania przewidzianego przepisami. Aby zapobiec pogorszeniu jakości wody, zamiast pokarmu dla ryb należy użyć surowca roślinnego, np. dodatku 0,5 % (w przeliczeniu na suchą masę) drobno zmielonych liści pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*), morwy białej (*Morus alba*), koniczyzny białej (*Trifolium repens*), szpinaku (*Spinacia oleracea*) lub innego surowca roślinnego (produktu *Cerophyl* lub alfa-celulozy). Dodanie pełnej dawki pokarmowej organicznego źródła pokarmu do osadu przed wzbogaceniem nie jest bez znaczenia w odniesieniu do jakości wody i działania biologicznego (21) ani nie jest metodą standardową, jednak ostatnie badania wskazują, że metoda ta jest skuteczna (19) (26). Dorosłe muchówki w klatce hodowlanej zwykle nie wymagają karmienia, jednak podanie tamponu z wełny bawełnianej nasączonego nasyconym roztworem sacharozy jako źródła pokarmu dla przepoczwarczonych osobników dorosłych zwiększa potencjał reprodukcyjny i płodność (34).

Warunki inkubacji

32. Po upływie 24 godzin od wprowadzenia larw w pierwszym stadium larwalnym obu generacji rozpoczyna się delikatnie napowietrzanie warstwy wody nadosadowej w naczyniach badawczych, które kontynuuje się przez cały okres badania (należy dbać, aby stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadło poniżej 60 % ASV). Napowietrzanie prowadzi się z użyciem szklanej pipety Pasteura, której wylot znajduje się 2–3 cm nad warstwą osadu, w ilości kilku pęcherzyków powietrza/sek. Przy badaniu lotnych chemikaliów można rozważyć rezygnację z napowietrzania układu osad-woda, jednocześnie należy jednak spełnić kryterium ważności wynoszące co najmniej 60 % ASV (pkt 10). Dalsze wytyczne przedstawiono w (16).
33. Badanie z wykorzystaniem *C. riparius* przeprowadza się w stałej temperaturze 20 °C (± 2 °C). Zalecane temperatury w przypadku *C. dilutus* i *C. yoshimatsui* to odpowiednio 23 °C i 25 °C (± 2 °C). Stosuje się 16-godzinny fotoperiod, a natężenie światła powinno wynosić 500–1 000 luksów. W przypadku klatek hodowlanych można uwzględnić dodatkowo jednogodzinną fazę brzasku i zmierzchu.

Okres narażenia

34. Projekt ze wzbogaconą wodą: w odniesieniu do pierwszego pokolenia okres narażenia zaczyna się w momencie wzbogacenia wody nadosadowej w naczyniu badawczym (co ma miejsce następnego dnia po umieszczeniu larw – ewentualne zmiany w projekcie narażenia przedstawiono w pkt 7). Narażenie drugiego pokolenia larw zaczyna się natychmiast, ponieważ umieszcza się je w układzie osad-woda, który został już wzbogacony. W odniesieniu do *C. riparius* i *C. yoshimatsui* maksymalny okres narażenia dla pierwszego pokolenia wynosi 27 dni, zaś dla drugiego pokolenia – 28 dni (larwy z pierwszego pokolenia spędzają jeden dzień w naczyniu bez narażenia). Uwzględniając nakładanie się okresów, całkowity czas badania wynosi w przybliżeniu 44 dni. W odniesieniu do *C. dilutus* maksymalne okresy narażenia wynoszą 64 i 65 dni, odpowiednio, dla pierwszego i drugiego pokolenia. Całkowity czas trwania wynosi w przybliżeniu 100 dni.

Projekt ze wzbogaconym osadem: W projekcie ze wzbogaconym osadem narażenie zaczyna się z chwilą dodania larw i wynosi maksymalnie 28 dni dla obu pokoleń *C. riparius* i *C. yoshimatsui* oraz maksymalnie 65 dni dla obu pokoleń *C. dilutus*.

Uwagi

Wylęg

35. Należy określić czas rozwoju i całkowitą liczbę w pełni przepoczwarczonych i żywych samców i samic muchówek dla obu pokoleń. Samce można łatwo zidentyfikować dzięki ich pierzastym czułkom i smukłej budowie ciała.
36. Naczynia badawcze zawierające oba pokolenia należy obserwować co najmniej trzy razy w tygodniu w celu wizualnej oceny ewentualnego nietypowego zachowania larw (np. porzucanie osadu, nietypowy sposób pływania) w porównaniu z próbą kontrolną. Podczas okresu wylęgu, który w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui* zaczyna się około 12 dni po umieszczeniu larw (20 dni w odniesieniu do *C. dilutus*), wylęgnięte muchówki liczy się i określa się ich płeć co najmniej raz, a najlepiej dwa razy dziennie (wcześnie rano i późnym popołudniem). Po identyfikacji muchówki z pierwszego pokolenia usuwa się ostrożnie z naczyń i przenosi do klatki hodowlanej. Muchówki z drugiego pokolenia usuwa się i uśmierca po zidentyfikowaniu. Wszystkie sznury jaj złożonych w naczyniu badawczym z pierwszym pokoleniem należy osobno zebrać i przenieść wraz z 2,5 ml wody z tego naczynia do 12-dołkowej mikropłytki (lub innego odpowiedniego naczynia), które jest przykrywane pokrywą, aby zapobiec znacznemu parowaniu. Należy także odnotować liczbę martwych larw i widocznych poczwarek, z których nie wylęgły się muchówki. Przykłady klatki hodowlanej, naczynia badawczego i wentylatora wyciągowego podano w dodatku 5.

Rozmnażanie

37. Wpływ na rozrodczość ocenia się na podstawie liczby sznurów jaj złożonych przez pierwsze pokolenie muchówek i płodności tych jaj. Sznury jaj zbiera się raz dziennie z krystalizatora umieszczonego w pojemniku hodowlanym. Sznury jaj złożonych w naczyniu badawczym należy zebrać i przenieść z 2,5 ml wody z tego naczynia do 12-dołkowej mikropłytki (umieszczając po jednym sznurze w każdym dołku) lub innych odpowiednich naczyń, które przykrywa się pokrywą, aby zapobiec znacznemu parowaniu. W odniesieniu do każdego sznura jaj dokumentuje się następujące cechy charakterystyczne: dzień zniesienia, wielkość (typowe, tj. $1,0 \pm 0,3$ cm lub małe; zwykle $\leq 0,5$ cm) i struktura (typowe= w kształcie banana ze spiralnie uformowanym sznurem jaj lub nietypowe, np. z niespiralnym sznurem jaj) oraz płodność (zapłodnione lub niezapłodnione). Zapłodnienie sznura jaj ocenia się w ciągu sześciu dni po ich złożeniu. Sznur jaj uznaje się za zapłodniony, jeżeli z co najmniej jednej trzeciej jaj wylęgają się larwy. Całkowitą liczbę samic umieszczonych w klatce hodowlanej wykorzystuje się do obliczenia liczby sznurów jaj przypadających na samicę i liczbę sznurów zapłodnionych jaj na samicę. Jeżeli jest to konieczne, można oszacować liczbę jaj w sznurze nie niszcząc go dzięki zastosowaniu metody zliczania pierścieni (przedstawionej szczegółowo w pkt 32 i 33).

Pomiary analityczne

Stężenie badanej substancji chemicznej

38. Na początku narażenia i na końcu badania trzeba przeanalizować co najmniej próbki wody nadosadowej, wody porowej i osadu (w przypadku wzbogacenia wody najlepiej godzinę po dodaniu substancji chemicznej) przy najwyższym i przy niższym stężeniu. Dotyczy to naczyń zawierających oba pokolenia. W odniesieniu do krystalizatorów w klatce hodowlanej analizuje się tylko wodę nadosadową, ponieważ z nią stykają się sznury jaj (w przypadku projektu ze wzbogaconym osadem można uwzględnić analityczne potwierdzenie stężenia substancji w osadzie). Dalsze pomiary stężenia substancji badanej w osadzie, wodzie porowej lub warstwie wody nadosadowej można przeprowadzić w trakcie badania, jeżeli uzna się je za konieczne. Takie oznaczenia stężenia badanej substancji chemicznej zapewniają informacje na temat zachowania/rozdziału badanej substancji w układzie woda-osad. Pobieranie próbek osadu i wody porowej na początku i w trakcie badania (zob. pkt 39) wymaga użycia dodatkowych naczyń badawczych w celu wykonania oznaczeń analitycznych. Pomiary stężenia w osadzie w projekcie ze wzbogaconą wodą mogą nie być konieczne, jeżeli rozdział badanej substancji chemicznej między wodę a osad został wyraźnie określony w badaniu wody/osadu w porównywalnych warunkach (np. stosunek osadu do wody, sposób dodania substancji, zawartość węgla organicznego w osadzie) albo jeżeli wykaże się, że mierzone stężenia w warstwie wody nadosadowej utrzymują się w przedziale 80–120 % nominalnych lub zmierzonych stężeń pierwotnych.
39. Gdy dokonuje się pomiarów pośrednich (np. w 7 lub 14 dni) lub jeśli do analizy potrzeba dużych próbek, których nie można pobrać z naczyń badawczych bez zakłócenia układu badawczego, należy dokonać oznaczeń analitycznych próbek pochodzących z dodatkowych naczyń badawczych przygotowanych w ten sam sposób (zawierających także organizmy użyte do badań), ale nie wykorzystywanych do obserwacji biologicznych.

40. Aby oddzielić wodę porową, zaleca się odwirowanie osadu np. przy 10 000 g w temp. 4 °C przez 30 min. Jeśli jednak badana substancja chemiczna nie ulega adsorpcji na filtry, dopuszczalna jest też filtracja. W niektórych przypadkach analiza stężeń w wodzie porowej może być niemożliwa do przeprowadzenia ze względu na zbyt małą objętość próbki.

Parametry fizykochemiczne

41. Wartość pH, stężenie rozpuszczonego tlenu w wodzie w naczyniach badawczych oraz temperaturę wody w naczyniach badawczych i krystalizatorach należy mierzyć w odpowiedni sposób (zob. pkt 10). Twardość wody i zawartość amoniaku należy zmierzyć w próbach kontrolnych oraz w jednym naczyniu badawczym i krystalizatorze przy najwyższym stężeniu na początku i na końcu badania.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

42. Celem badania pełnego cyklu życia jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na rozmnażanie oraz tempo rozwoju i całkowitą liczbę w pełni przepoczwarczonych i żywych samców i samic muchówek z dwóch pokoleń. W celu obliczenia tempa wylęgu dane dotyczące osobników męskich i żeńskich powinny zostać połączone. Jeśli nie ma wskazań dotyczących statystycznie istotnych różnic wrażliwości w tempie rozwoju osobników każdej płci, wyniki dotyczące osobników męskich i żeńskich mogą zostać połączone do celów analizy statystycznej.
43. Stężenia efektywne, wyrażone jako stężenia w wodzie nadosadowej (w przypadku wzbogaconej wody) lub w osadzie (w przypadku wzbogaconego osadu), oblicza się zwykle w oparciu o zmierzone stężenia na początku narażenia (zob. pkt 38). W związku z tym w przypadku wzbogaconej wody stężenia mierzone zazwyczaj na początku narażenia w wodzie nadosadowej w naczyniach zawierających oba pokolenia i w krystalizatorach uśrednia się dla każdego zabiegu. W przypadku wzbogaconego osadu stężenia mierzone zwykle na początku narażenia w naczyniach zawierających oba pokolenia (i opcjonalnie w krystalizatorach) uśrednia się dla każdego zabiegu.
44. Aby dokonać oszacowania punktowego, np. EC_x , jako prawdziwe kontrpróby można wykorzystywać dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń i klatek hodowlanych. Przy obliczaniu przedziału ufności dla EC_x należy uwzględnić zmienność między naczyniami lub należy wykazać, że zmienność ta jest na tyle niewielka, że można ją pominąć. Jeżeli model został dopasowany przy użyciu metody najmniejszych kwadratów, do danych statystycznych dotyczących poszczególnych naczyń należy zastosować przekształcenie, aby poprawić jednorodność wariancji. Wartości EC_x należy jednak obliczać po przekształceniu odpowiedzi z powrotem na wartość pierwotną (31).
45. W przypadku gdy analiza statystyczna ma na celu określenie wartości NOEC metodą testowania hipotez, należy uwzględnić zmienność między naczyniami, co gwarantuje zastosowanie analizy wariancji ANOVA (np. procedur testu Williamsa i Dunnetta). Test Williamsa byłby odpowiedni w przypadkach, gdy teoretycznie oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź, a test Dunnetta – gdy hipoteza dotycząca monotoniczności nie jest spełniona. Ewentualnie w przypadkach, w których występują naruszenia zwykłych założeń analizy wariancji ANOVA (31), odpowiednie mogą być bardziej odporne testy (27).

Tempo wylęgu

46. Tempa wylęgu są danymi binarnymi i można je analizować z wykorzystaniem testu Cochran-Armitage'a stosowanego regresywnie w przypadku gdy oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź i dane te są zgodne z przewidywaniami. W innym przypadku można zastosować test dokładny Fishera lub test Mantela-Haenszela z wartościami p skorygowanymi metodą Bonferroniego-Holma. Jeśli są dowody na większą zmienność między kontrpróbami w ramach tego samego stężenia niż wskazywałby na to rozkład dwumianowy (co określa się często jako zmienność większą niż zmienność w rozkładzie dwumianowym), wówczas należy zastosować odporny test Cochran-Armitage'a lub test dokładny Fishera, tak jak proponuje się w pozycji (27) w bibliografii.

Określa się sumę żywych przepoczwarczonych muchówek (samców i samic) na każde naczynie, n_e , i dzieli przez liczbę wprowadzonych larw, n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

gdzie:

ER = współczynnik wylęgu

n_e = liczba żywych przepoczwarczonych muchówek na każde naczynie

n_a = liczba wprowadzonych larw na każde naczynie (zwykle 20).

Kiedy wartość n_e jest większa niż n_a (tj. kiedy w niezamierzony sposób wprowadzono większą liczbę larw niż przewidziano), należy wyrównać n_a i n_e .

47. Najwłaściwszą alternatywą w przypadku dużych próbek, w których występuje wariancja większa niż wariancja w rozkładzie dwumianowym, jest traktowanie współczynnika wylęgu jako odpowiedzi ciągłej i stosowanie procedur zgodnych z danymi dotyczącymi współczynnika wylęgu. Uznaje się, że próbka jest duża, gdy zarówno liczba przepoczwarczonych, jak i nieprzepoczwarczonych muchówek, przekracza pięć na każde naczynie stanowiące kontrpróbę.
48. Aby zastosować metody analizy wariancji ANOVA, wartości współczynnika wylęgu należy najpierw przekształcić, stosując przekształcenie pierwiastkowe i arcsin lub przekształcenie Freemana-Tukeya w celu otrzymania przybliżonego rozkładu normalnego i wyrównania wariancji. Przy użyciu częstości bezwzględnych można zastosować test Cochran-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela. Przekształcenie pierwiastkowe i arcsin stosuje się, wyznaczając funkcję odwrotną względem sinusa ($\sin^{-1}$) pierwiastka współczynnika wylęgu ER.
49. W odniesieniu do współczynników wylęgu wartości EC_x oblicza się stosując analizę regresji (np. analizę probitową, logitową lub analizę Weibulla (28)). Jeśli analiza regresji zawodzi (np. w przypadku gdy występują mniej niż dwie częściowe odpowiedzi), stosuje się inne metody nieparametryczne, takie jak średnia krocząca lub prosta interpolacja.

Tempo rozwoju

50. Średni czas rozwoju to średni okres, jaki mija od wprowadzenia larw (dzień 0 badania) do wylęgu muchówek tworzących kohortę badaną (w celu policzenia rzeczywistego czasu rozwoju należy uwzględnić wiek larw w chwili wprowadzenia). Tempo rozwoju (jednostka: 1/dzień) stanowi odwrotność czasu rozwoju i przedstawia tę część rozwoju larwy, która następuje każdego dnia. Do celów oceny omawianych badań dotyczących toksyczności w osadzie preferowane jest tempo rozwoju, jako że jego wariancja jest mniejsza, jest bardziej jednorodna i bliższa normalnemu rozkładowi w porównaniu z czasem rozwoju. Dlatego silniejsze metody parametryczne badania można stosować raczej w odniesieniu do tempa rozwoju niż do czasu rozwoju. Dla tempa rozwoju jako odpowiedzi ciągłej można oszacować wartości EC_x , stosując analizę regresji (zob. np. (29) (30)). Wartość NOEC dla średniego tempa rozwoju można określić przez zastosowanie metod analizy wariancji ANOVA, np. testu Williamsa lub Dunnetta. W związku z tym, że samce wylęgają się wcześniej niż samice, tj. ich tempo rozwoju jest szybsze, warto obliczyć tempo rozwoju oddzielnie dla każdej płci oprócz tempa dla wszystkich muchówek.
51. Do badań statystycznych przyjmuje się, że liczba muchówek zaobserwowanych w dniu kontroli x przepoczwarzyła się w średniej odstęp czasu między dniem x a dniem $x-1$ (l = odstęp czasu między kontrolami, zwykle 1 dzień). Średnia tempa rozwoju na każde naczynie ($\bar{x}$) liczona jest według następującego wzoru:

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

gdzie:

$\bar{x}$: średnia tempa rozwoju na każde naczynie

i : wskaźnik odstępu czasowego między kontrolami

m : maksymalna liczba odstępów czasowych między kontrolami

f_i : liczba muchówek przepoczwarczonych w odstępie czasu między kontrolami i

n_c : całkowita liczba muchówek przepoczwarczonych na koniec doświadczenia (Σf_i)

x_i : tempo rozwoju muchówek przepoczwarczonych między kontrolami i

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

gdzie:

day_i : dzień kontroli (liczba dni od wprowadzenia larw)

l_i : odstęp czasu między kontrolami i (w dniach, zwykle 1 dzień)

Proporcja płci

52. Proporcje płci są danymi binarnymi i w związku z tym należy je oceniać za pomocą dokładnego testu Fischera lub innych odpowiednich metod. Naturalna proporcja płci w przypadku *C. riparius* wynosi jeden, tj. samce i samice występują tak samo licznie. Dane dotyczące proporcji płci należy traktować identycznie dla obu pokoleń. W związku z tym, że maksymalna liczba muchówek na naczynie (tj. 20) jest zbyt mała, by można było dokonać znaczącej analizy statystycznej, sumuje się całkowitą liczbę w pełni przepoczwarczonych i żywych muchówek każdej płci we wszystkich naczyniach użytych w jednym zabiegu. Te nieprzekształcone dane testuje się w odniesieniu do próby kontrolnej (z rozpuszczalnikiem) lub połączonych danych z prób kontrolnych w tablicy wielodzielczej 2×2 .

Rozmnażanie

53. Rozmnażanie, podobnie jak potencjał reprodukcyjny, oblicza się jako liczbę sznurów jaj przypadającą na samicę. Konkretnie całkowitą liczbę sznurów jaj złożonych w klatce hodowlanej dzieli się przez całkowitą liczbę żywych i nieuszkodzonych samic dodanych do tej klatki. Wartość NOEC dla potencjału reprodukcyjnego można określić przez zastosowanie metod analizy wariancji ANOVA, np. testu Williamsa lub Dunnetta.
54. Płodność sznurów jaj służy do ilościowego określenia liczby sznurów zapłodnionych jaj na samicę. Całkowitą liczbę sznurów zapłodnionych jaj złożonych w klatce hodowlanej dzieli się przez całkowitą liczbę żywych i nieuszkodzonych samic dodanych do tej klatki. Wartość NOEC dla płodności można określić przez zastosowanie metod analizy wariancji ANOVA, np. testu Williamsa lub Dunnetta.

Sprawozdanie z badania

55. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

- cechy fizyczne i, w stosownych przypadkach, właściwości fizykochemiczne (rozpuszczalność w wodzie, prężność par, $\log K_{ow}$, współczynnik podziału w glebie (lub w osadzie, jeśli jest dostępny), stabilność w wodzie itd.);
- tożsamość substancji chemicznej (nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna, wzór strukturalny, numer CAS itp.), w tym czystość i metoda analityczna oznaczania ilościowego badanej substancji chemicznej.

Badany gatunek:

- organizmy użyte do badań: gatunek, nazwa naukowa, źródło organizmów i warunki hodowli;
- informacje dotyczące postępowania z pakietami jaj i larwami;

- informacje dotyczące postępowania z przepoczwarzonymi osobnikami dorosłymi z pierwszego pokolenia za pomocą wentylatora wyciągowego itd. (zob. dodatek 5);
- wiek organizmów użytych do badania z pierwszego i drugiego pokolenia w momencie umieszczenia w naczyniu badawczym.

Warunki badania:

- użyty osad, tj. osad naturalny lub preparowany (sztuczny);
- w odniesieniu do osadu naturalnego – lokalizacja i opis miejsca pobrania próbki osadu, w tym, jeśli to możliwe, historia zanieczyszczeń; charakterystyka osadu: pH, zawartość węgla organicznego, stosunek C/N i granulometria (w stosownych przypadkach);
- w odniesieniu do osadu preparowanego – przygotowanie, składniki i charakterystyka (zawartość węgla organicznego, pH, wilgotność itd. na początku badania);
- przygotowanie wody do badań (jeśli stosowana jest woda regenerowana) i jej charakterystyka (stężenie tlenu, pH, przewodność właściwa, twardość itd. na początku badania);
- grubość warstwy osadu i warstwy wody nadosadowej w odniesieniu do naczyń badawczych i krystalizatorów;
- objętość warstwy wody nadosadowej i wody porowej; masa mokrego osadu z wodą porową i bez niej w odniesieniu do naczyń badawczych i krystalizatorów;
- naczynia badawcze (materiał i wielkość);
- krystalizatory (materiał i wielkość);
- klatki hodowlane (materiał i wielkość);
- metody przygotowania roztworów podstawowych i badanych stężeń w odniesieniu do naczyń badawczych i krystalizatorów;
- umieszczenie badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych i krystalizatorach; badane stężenia, liczba kontrprób i rozpuszczalników, jeżeli były potrzebne;
- warunki inkubacji w odniesieniu do naczyń badawczych: temperatura, cykl i natężenie oświetlenia, napowietrzanie (pęcherzyki powietrza na sekundę);
- warunki inkubacji w odniesieniu do klatek hodowlanych i krystalizatorów: temperatura, cykl i natężenie oświetlenia;
- warunki inkubacji w odniesieniu do sznurów jaj na mikropłytkach (lub w innych naczyniach): temperatura, cykl i natężenie oświetlenia;
- szczegółowe informacje o żywieniu, w tym rodzaj pokarmu, przygotowanie, schemat żywienia i ilość pokarmu.

Wyniki:

- nominalne badane stężenia, zmierzone badane stężenia i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenie badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych i krystalizatorach;
- jakość wody w naczyniach badawczych i krystalizatorach, tj. pH, temperatura, rozpuszczony tlen, twardość i zawartość amoniaku;
- uzupełnienie wyparowanej wody do badań, jeśli miało miejsce;
- liczba przepoczwarzonych samców i samic muchówek na każde naczynie na każdy dzień w pierwszym i drugim pokoleniu;
- stosunek płci w pełni przepoczwarzonych i żywych muchówek na zabieg w pierwszym i drugim pokoleniu;
- liczba nieprzepoczwarzonych larw, na każde naczynie w pierwszym i drugim pokoleniu;
- odsetek wylęgu na każdą kontrpróbę na każde badane stężenie (samice i samce muchówek łącznie) w pierwszym i drugim pokoleniu;
- średnie tempo rozwoju w pełni przepoczwarzonych i żywych muchówek na każdą kontrpróbę oraz zabieg (samice i samce muchówek oddzielnie i łącznie) w pierwszym i drugim pokoleniu;

- liczba sznurów jaj złożonych w krystalizatorach na klatkę hodowlaną na dzień;
- charakterystyka każdego sznura jaj (wielkość, kształt i płodność);
- potencjał reprodukcyjny – całkowita liczba sznurów jaj na całkowitą liczbę samic dodanych do klatki hodowlanej;
- płodność – całkowita liczba sznurów zapłodnionych jaj przypadająca na całkowitą liczbę samic dodanych do klatki hodowlanej;
- oszacowania toksycznych punktów końcowych, np. EC_x (i powiązane przedziały ufności), wartość stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) i metody statystyczne użyte do ich określenia;
- omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Rozdział C.28 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconej wody.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. i 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. Sprawozdanie końcowe dla Komisji Europejskiej. Nr sprawozdania: EC 3738. Sierpień 1994 r. WRc, Zjednoczone Królestwo.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, warsztaty WOSTA w Holandii.
- (5) ASTM International (2009) E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. W: Annual Book of ASTM Standards, tom 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, grudzień 1997.
- (7) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Wydanie 2. EPA 600/R-99/064, marzec 2000 r. Zmiana wydania 1 z czerwca 1994 r.
- (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*), sprawozdanie techniczne, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Kanada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. i 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. i 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) Rozdział C.27 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconego osadu.

- (16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paryż.
- (17) Weltje, L., Ruffli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
- (18) Environment Canada. (1995), *Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*, sprawozdanie EPS 1/RM/30, wrzesień 1995 r.
- (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. i J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- (21) Naylor, C. i C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
- (24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- (25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. i 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. i 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. i 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*, Seria OECD w sprawie badań i oceny Nr 54, 146 s., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paryż.
- (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. i 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. i 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*, publikacja w przygotowaniu, Seria dotycząca badań i oceny, OECD, Paryż.

*Dodatek 1***Definicje**

Do celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Osad preparowany lub odtworzony, sztuczny lub syntetyczny stanowi mieszaninę materiałów używaną do symulowania fizycznych składników naturalnego osadu.

Woda nadosadowa to woda, którą zalano osad w naczyniu badawczym.

Woda porowa to woda wypełniająca przestrzeń między cząstkami osadu i gleby.

Woda wzbogacona to woda do badań, do której dodano badaną substancję chemiczną.

Badana substancja chemiczna oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

Dodatek 2

Zalecenia dotyczące hodowli *Chironomus riparius*

1. Larwy ochotki (*Chironomus*) można hodować w krystalizatorach lub większych pojemnikach. Na dnie pojemnika rozprowadza się drobny piasek kwarcowy, tworząc cienką warstwę o grubości 5–10 mm. Odpowiednim substratem okazała się także ziemia okrzemkowa (np. Merck, Art 8117) (wystarczająca jest cieńsza warstwa grubości najwyżej kilku milimetrów). Następnie dodaje się odpowiednią wodę na wysokość kilku centymetrów. Poziomą wodę należy uzupełniać, aby wyrównać stratę spowodowaną parowaniem i zapobiec wysychaniu. Wodę w razie konieczności można wymieniać. Należy zapewnić delikatne napowietrzanie. Naczynia do chowu larw należy przechowywać w odpowiedniej klatce, aby zapobiec ucieczce przepoczwarczonych osobników dorosłych. Klatka powinna być na tyle duża, by umożliwić rojenie przepoczwarczonych osobników dorosłych, w przeciwnym razie może nie dojść do kopulacji (co najmniej ok. 30 × 30 × 30 cm).
2. Klatki powinny być trzymane w temperaturze pokojowej lub w pomieszczeniu o stałych warunkach środowiska w temperaturze 20 ± 2 °C z fotoperiodem wynoszącym 16 godzin światła (o natężeniu ok. 1 000 luksów) i 8 godzin ciemności. Odnotowywano, że wilgotność powietrza mniejsza niż 60 % wilgotności względnej może utrudniać rozmnażanie.

Woda rozcieńczająca

3. Można stosować każdy rodzaj wody naturalnej lub syntetycznej. Powszechnie stosowana jest woda studzienna, odchlorowana woda wodociągowa i sztuczne roztwory (np. Elendt »M4« lub »M7«, zob. również poniżej). Woda przed użyciem powinna być napowietrzona. W miarę potrzeby woda do hodowli może być wymieniana przez ostrożne odlewanie lub syfonowanie zużytej wody z naczyń hodowlanych bez niszczenia rurek larw.

Karmienie larw

4. Larwom *Chironomus* należy podawać pokarm w płatkach dla ryb (Tetra Min®, Tetra Phyll® lub innej marki pokarm dla ryb) w ilości ok. 250 mg na każde naczynie dziennie. Można podawać pokarm w postaci suchego mielonego proszku lub zawiesiny w wodzie: 1,0 g pokarmu w płatkach dodaje się do 20 ml wody rozcieńczającej i rozdrabnia się w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny. Preparat taki można stosować jako pokarm w ilości ok. 5 ml na każde naczynie na dzień (przed użyciem wstrząsnąć). Starsze larwy mogą dostawać go więcej.
5. Żywienie dostosowuje się do jakości wody. Jeśli podłoże hodowlane staje się mętne, należy ograniczyć karmienie. Podawanie pokarmu należy starannie monitorować. Zbyt mała ilość pokarmu spowoduje migrację larw w kierunku warstwy wody, a zbyt duża wywoła zwiększoną aktywność mikroorganizmów i zmniejszone stężenie tlenu. Oba rodzaje warunków mogą spowodować ograniczenie tempa wzrostu.
6. Przygotowując nowe naczyni do hodowli, można też dodać komórki niektórych gatunków zielenic (np. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Karmienie przepoczwarczonych osobników dorosłych

7. Niektórzy badacze sugerują, by do karmienia przepoczwarczonych osobników dorosłych używać tamponu z wełny bawełnianej nasączonego nasyconym roztworem sacharozy.

Wylęg

8. Przy temperaturze 20 ± 2 °C po ok. 13–15 dniach w naczyniach do hodowli larw uwalniają się z poczwarek osobniki dorosłe. Samce łatwo zidentyfikować dzięki pierzastym czułkom i smukłej budowie ciała.

Pakiety jaj

9. Z chwilą pojawienia się w klatce hodowlanej osobników dorosłych należy trzy razy w tygodniu sprawdzać we wszystkich naczyniach do chowu larw, czy nie zostały złożone galaretowate pakiety jaj. Jeśli zostały złożone, należy je ostrożnie usunąć. Należy przenieść je do niewielkiego naczynia zawierającego próbkę wody używanej do hodowli. Pakiety jaj wykorzystuje się do zapoczątkowania hodowli w nowym naczyniu (np. 2–4 pakietów jaj na naczynie) lub do badań toksyczności.
10. Larwy w pierwszym stadium larwalnym powinny wylęgnąć się po 2–3 dniach.

Przygotowanie hodowli w nowych naczyniach

11. Po założeniu hodowli powinno być możliwe założenie nowego naczynia z nową hodowlą larw raz na tydzień lub rzadziej, w zależności od wymogów badania, przy czym usuwa się starsze naczynia po pojawieniu się w nich dorosłych muchówek. Stosując ten system, uzyskuje się stałe źródło zaopatrzenia w dorosłe osobniki przy zminimalizowaniu zarządzania.

Przygotowanie roztworów do badań »M4« i »M7«

12. Roztwór »M4« został opisany przez Elendta (1990). Roztwór »M7« przygotowuje się jak roztwór »M4« z wyjątkiem substancji wskazanych w tabeli 1, których stężenie w »M7« jest czterokrotnie mniejsze niż w »M4«. Roztwór do badań nie powinien być przygotowywany zgodnie z instrukcjami Elendta i Biasa (1990), ponieważ stężenia $\text{NaSiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 i K_2HPO_4 podane dla przygotowania roztworów podstawowych nie są odpowiednie.

Przygotowanie roztworu »M7«

13. Każdy roztwór podstawowy (I) przygotowuje się oddzielnie, a z roztworów podstawowych (I) przygotowuje się łączony roztwór podstawowy (II) (zob. tabela 1). W celu przygotowania roztworu »M7« 50 ml połączonego roztworu podstawowego (II) oraz podane w tabeli 2 ilości każdego roztworu podstawowego makroskładnika odżywczego dopełnia się do 1 litra wodą dejonizowaną. Roztwór podstawowy witamin przygotowuje się przez dodanie trzech witamin do wody dejonizowanej, jak wskazano w tabeli 3, a do końcowego roztworu »M7« na krótko przed użyciem dodaje się 0,1 ml łączonego roztworu podstawowego witamin. Roztwór podstawowy witamin przechowuje się zamrożony w małych podwielokrotnościach. Roztwór jest napowietrzany i stabilizowany.

Tabela 1

Roztwory podstawowe pierwiastków śladowych w odniesieniu do roztworów M4 i M7

Roztwory podstawowe (I)	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną	W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego (II): zmieszać następujące ilości (ml) roztworów podstawowych (I) i dopełnić do 1 litra wodą dejonizowaną		Końcowe stężenia w roztworach do badań (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (l)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (l)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (l)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (l)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (l)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (l)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (l)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (l)	335	1,0	0,25	0,017	0,004

Roztwory podstawowe (I)	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną	W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego (II): zmniejszać następujące ilości (ml) roztworów podstawowych (I) i dopełnić do 1 litra wodą dejonizowaną		Końcowe stężenia w roztworach do badań (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾ 1 991	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Substancje te różnią się w odniesieniu do M4 i M7, jak określono powyżej.

⁽²⁾ Roztwory te są przygotowywane oddzielnie, następnie łączone ze sobą i niezwłocznie poddawane sterylizacji w autoklawie.

Tabela 2

Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych w odniesieniu do roztworów M4 i M7

	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną (mg)	Ilość roztworów podstawowych makroskładników odżywczych w celu przygotowania roztworów M4 i M7 (ml/l)	Końcowe stężenia w roztworach do badań M4 i M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Tabela 3

Roztwór podstawowy witamin dla roztworów M4 i M7

Wszystkie trzy roztwory witamin łączy się, by otrzymać jeden roztwór podstawowy witamin.

	Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną (mg)	Ilość (ml/l) roztworu podstawowego witamin dodawanego w celu przygotowania roztworów M4 i M7 (ml/l)	Końcowe stężenia w roztworach do badań M4 i M7 (mg/l)
Chlorowodorek tiaminy	750	0,1	0,075
Cyjanokobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotyna	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFIA

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, M. Streloke i H. Köpp (red.), Berlin. Berlin.

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

Elendt, B.P. i 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.

Dodatek 3

Przygotowanie osadu preparowanego

SKŁAD OSADU

Skład osadu preparowanego powinien być następujący:

Składnik	Właściwości	% suchej masy osadu
Torf	Torf sfagnowy, w miarę możliwości o wartości pH równej 5,5–6,0, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm), suszony powietrzem	4 – 5
Piasek kwarcowy	Wielkość ziaren: > 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm	75 – 76
Glinka kaolinowa	Zawartość kaolinitu ≥ 30 %	20
Węgiel organiczny	Korygowany przez dodanie torfu i piasku	2 ($\pm 0,5$)
Węglan wapnia	CaCO_3 , sproszkowany, czysty chemicznie	0,05 – 0,1
Woda	Przewodność właściwa ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30 – 50

PRZYGOTOWANIE

Torf suszy się powietrzem i mieli na drobny proszek. Zawiesinę wymaganej ilości proszku torfowego w wodzie dejonizowanej przygotowuje się z użyciem wysokosprawnego urządzenia do homogenizacji. Wartość pH zawiesiny koryguje się do poziomu $5,5 \pm 0,5$, stosując CaCO_3 . W celu ustabilizowania pH i komponentu mikrobiologicznego zawiesinę kondycjonuje się przez co najmniej dwa dni w temperaturze 20 ± 2 °C, delikatnie mieszając. Ponownie mierzy się pH, którego wartość powinna wynosić $6,0 \pm 0,5$. Następnie zawiesinę torfową miesza się z innymi składnikami (piaskiem i gliną kaolinową) oraz wodą dejonizowaną, aby otrzymać jednorodny o zawartości wody w przedziale 30–50 % suchej masy osadu. Ponownie mierzy się wartość pH końcowej mieszaniny i koryguje w miarę potrzeby za pomocą CaCO_3 do poziomu 6,5 – 7,5. Próbkę osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość węgla organicznego. Następnie, przed ich wykorzystaniem w badaniu toksyczności na ochotkowatych, zaleca się kondycjonowanie osadu preparowanego przez siedem dni w tych samych warunkach, w jakich zostanie przeprowadzone badanie.

PRZECHOWYWANIE

Suche składniki do przygotowywania sztucznego osadu mogą być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu w temperaturze pokojowej. Nie należy przechowywać (mokrego) osadu preparowanego przed jego użyciem do badania. Osad należy wykorzystać natychmiast po 7-dniowym okresie kondycjonowania, kończącym proces jego przygotowania.

BIBLIOGRAFIA

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, wytyczna nr 207 w sprawie badań, Wytyczne dotyczące badania substancji chemicznych, OECD, Paryż.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. i B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludge worms (*Oligochaeta*) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety* 39: 10-20.

Dodatek 4

Właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej

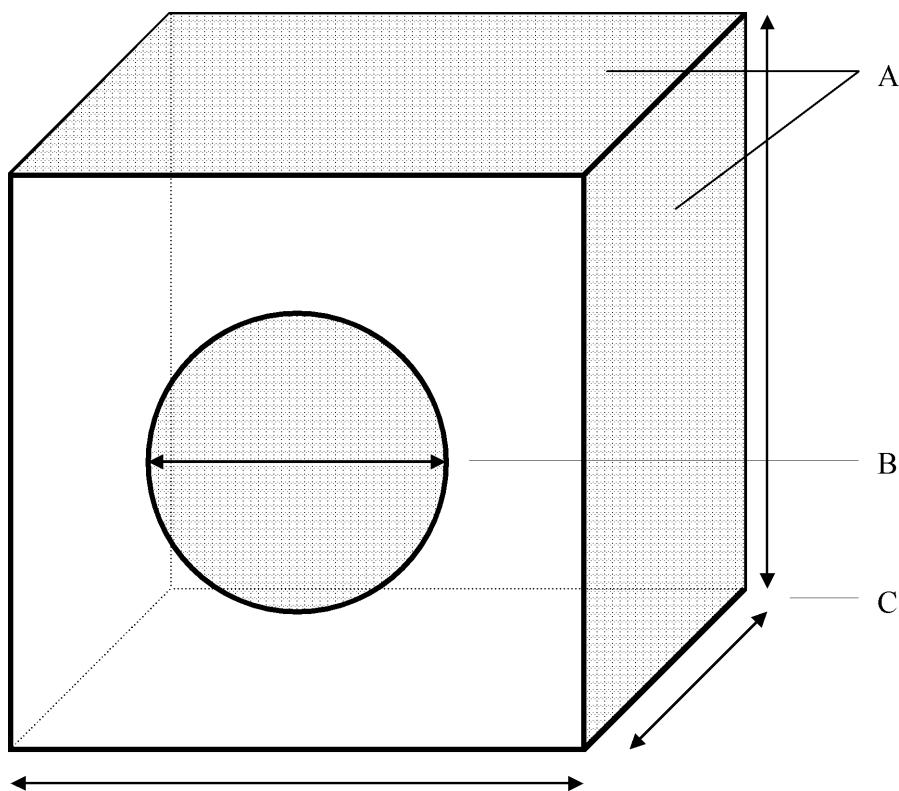
SKŁADNIK	STĘŻENIA
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Twardość wyrażona jako CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Pestycydy fosforoorganiczne ogółem	< 50 ng/l
Pestycydy chloroorganiczne ogółem plus polichlorowane bifenyle	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

(*) Jeśli jednak zachodzi podejrzenie interakcji między jonami powodującymi twardość wody a badaną substancją chemiczną, należy stosować wodę o mniejszej twardości (w takim przypadku nie należy zatem stosować roztworu Elendta M4).

Dodatek 5

Wytyczne dotyczące przeprowadzania badania

Przykład klatki hodowlanej:

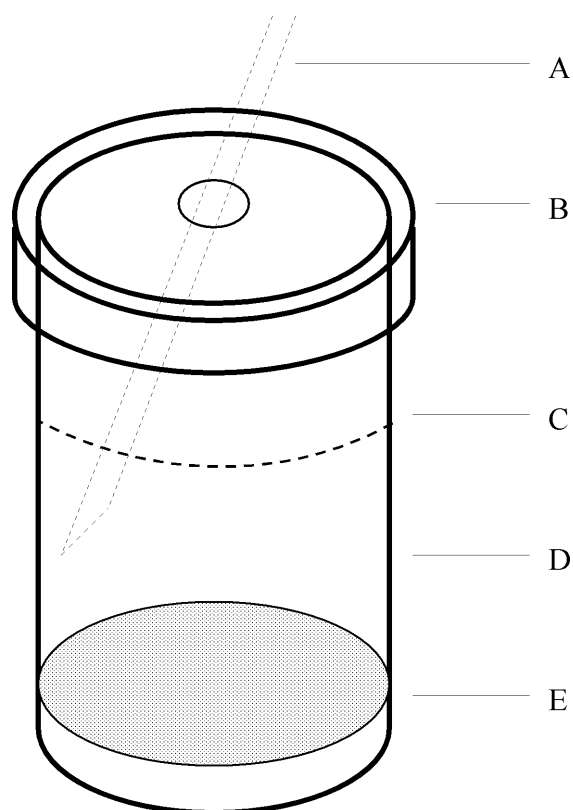


A: siatka na górnej części i co najmniej na jednej ścianie klatki (wielkość oczek ok. 1 mm)

B: otwór do umieszczania przepoczwarzonych osobników dorosłych wewnątrz klatki hodowlanej i usuwania złożonych sznurów jaj z krystalizatorów (nie przedstawionych na rysunku)

C: minimalne wymiary klatki hodowlanej: długość 30 cm, wysokość 30 cm, szerokość 30 cm

Przykład naczynia badawczego:



A: pipeta Pasteura jako doprowadzenie powietrza do warstwy wody nadosadowej

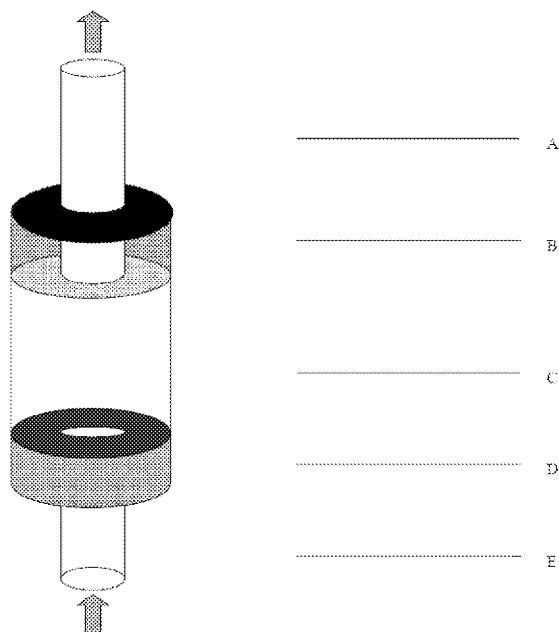
B: szklana pokrywa zapobiegająca ucieczce muchówek

C: warstwa powierzchniowa wody

D: naczynie badawcze (szklana zlewka o pojemności min. 600 ml)

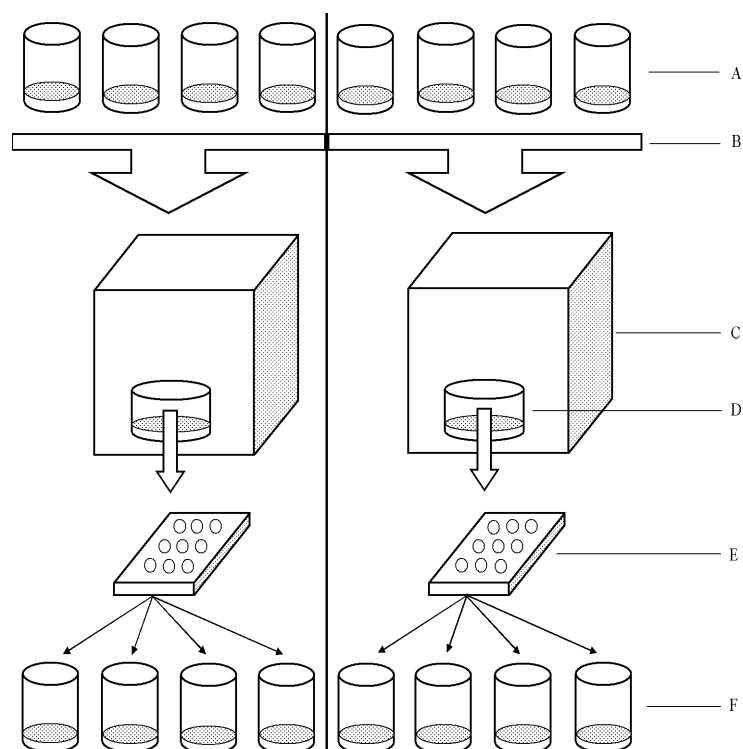
E: warstwa osadu

Przykład wentylatora wyciągowego do pozyskiwania dorosłych muchówek (strzałki wskazują kierunek przepływu powietrza):



- A: rurka szklana (średnica wewnętrzna ok. 5 mm) połączona z pompą samozasysającą
- B: korek z gumy z otworem na szklaną rurkę (A). Po stronie wewnętrznej, otwór szklanej rurki (A) jest zakryty bawełną i siatką (wielkość oczek ok. 1 mm), aby zapobiec uszkodzeniu muchówek podczas ich zasysania do wentylatora wyciągowego.
- C: przezroczysty pojemnik (z tworzywa sztucznego lub szkła, długość ok. 15 cm) na schwytane muchówki
- D: korek z gumy z otworem na rurkę (E). Aby wprowadzić muchówki do klatki hodowlanej, należy wyjąć korek D z pojemnika C.
- E: rurka (z tworzywa sztucznego lub szkła, średnica wewnętrzna ok. 8 mm) do zbierania schwytanych muchówek z naczynia

Schematyczna prezentacja badania cyklu życia



- A: 1. pokolenie – naczynia badawcze z układem osad-woda, osiem kontrprób, 20 larw w pierwszym stadium larwalnym na naczynie
- B: cztery naczynia badawcze na każdą klatkę hodowlaną, A i B
- C: klatki hodowlane (A i B) do rojenia, godów i składania jaj
- D: krystalizatory do umieszczania sznurów jaj
- E: mikropłytki, jeden dołek na każdy sznur jaj
- F: 2. pokolenie – naczynia badawcze z układem osad-woda, osiem kontrprób, 20 larw w pierwszym stadium larwalnym na naczynie

C.41. Badanie rozwoju płciowego ryb

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 234 (2011 r.) w sprawie badań. Jej podstawą jest decyzja z 1998 r. mająca na celu opracowanie nowych lub aktualizację istniejących metod badawczych na potrzeby przeglądu i badania substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Badanie rozwoju płciowego ryb zidentyfikowano jako obiecującą metodę badawczą, obejmującą wrażliwy etap życia ryb, na którym reagują na substancje chemiczne o charakterze zbliżonym zarówno do estrogenów, jak i androgenów. Wspomniana metoda badawcza przeszła proces weryfikacji międzylaboratoryjnej w latach 2006–2010, w ramach której sprawdzono ryzankę japońską (*Oryzias latipes*), danio pręgowanego (*Danio rerio*) i ciernika (*Gasterosteus aculeatus*), a *Pimephales promelas* zweryfikowano częściowo (41) (42) (43). Niniejszy protokół dotyczy ryzanki japońskiej, ciernika i danio pręgowanego. Zasadniczo protokół ten stanowi rozszerzenie wytycznej OECD nr 210 w sprawie badań »Badanie toksyczności ryb na wczesnym etapie życia« (*Fish Early Life Stage Toxicity Test*) (1), przy czym narażenie kontynuuje się do momentu zróżnicowania ryb pod względem płci, tj. około 60 dni po wykluciu w przypadku ryzanki japońskiej, ciernika i danio pręgowanego (okres narażenia może być krótszy lub dłuższy w przypadku innych gatunków, które zostaną zweryfikowane w przyszłości), i dodaje się punkty końcowe określające wrażliwość układu hormonalnego. W badaniu rozwoju płciowego ryb ocenia się wpływ i potencjalne niekorzystne skutki substancji chemicznych przypuszczalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (np. estrogenów, androgenów i inhibitorów steroidogenezy) dla rozwoju płciowego ryb na wczesnym etapie ich życia. Dzięki połączeniu dwóch podstawowych punktów końcowych określających wpływ na układ hormonalny, stężenia witellogeniny (VTG) i fenotypowej proporcji płci badanie umożliwia pokazanie sposobu działania badanej substancji chemicznej. Ze względu na zmianę fenotypowej proporcji płci istotną dla danej populacji badanie rozwoju płciowego ryb można wykorzystać do oceny zagrożenia i ryzyka. Jeżeli badanie stosuje się w celu oceny zagrożenia i ryzyka, nie należy wykorzystywać w nim ciernika, ponieważ dostępne do chwili obecnej dane weryfikacyjne wykazały, że w przypadku tego gatunku zmiany w fenotypowej proporcji płci wywołane przez badane substancje chemiczne występowały rzadko.
2. Protokół opiera się na badaniu ryb narażonych przez wodę na działanie substancji chemicznych podczas nietrwałego okresu płciowego, w którym oczekuje się, że ryby będą najbardziej wrażliwe na wpływ substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Dokonuje się pomiaru dwóch podstawowych punktów końcowych będących wskaźnikami aberracji rozwojowych związanych z układem hormonalnym, stężenia VTG i proporcji płci (proporcji między płciami) określonych na podstawie histologii gonad. Histopatologia gonad (ocena i określenie etapów rozwoju oocytów i komórek spermatogenetycznych) nie jest obowiązkowa. Dodatkowo określa się w miarę możliwości płęć genetyczną (np. w przypadku ryzanki japońskiej i ciernika). Obecność markera płci genetycznej stanowi znaczną zaletę, ponieważ zwiększa moc statystyk dotyczących proporcji płci i umożliwia wykrycie odwrócenia płci fenotypowej. Inne szczytowe punkty końcowe, które należy zmierzyć, obejmują wskaźnik wylęgłości, przeżywalność, długość i masę ciała. Niniejszą metodę badawczą można dostosować do gatunków innych niż wspomniane powyżej, pod warunkiem że: (i) te inne gatunki zostaną poddane walidacji równorzędnej weryfikacji przeprowadzonej w przypadku ryzanki japońskiej, ciernika i danio pręgowanego; (ii) próba kontrolna ryb jest zróżnicowana pod względem płci pod koniec badania; (iii) poziomy VTG są na tyle wysokie, że umożliwiają wykrycie zmian związanych z substancją chemiczną; oraz (iv) wrażliwość układu badawczego określa się, stosując substancje chemiczne odniesienia zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego ((anty)estrogeny, (anty)androgeny, inhibitory aromatazy itd.). Ponadto każde sprawozdanie z weryfikacji odnoszące się do badania rozwoju płciowego ryb powinno zostać ocenione przez OECD, a wyniki weryfikacji powinny zostać uznane za satysfakcjonujące.

Uwagi wstępne i ograniczenia

3. VTG jest prawidłowo wytwarzana w wątrobie jajorodnych samic kręgowców w reakcji na endogenne estrogeny w układzie krążenia (2). Jest ona prekursorem białek żółtka i po wytworzeniu w wątrobie jest przenoszona przez krew do jajnika, gdzie jest pobierana i modyfikowana przez rozwijające się komórki jajowe. Synteza VTG jest bardzo ograniczona, choć wykrywalna, u niedojrzałych płciowo ryb i dorosłych samców ryb, ponieważ nie mają wystarczającej ilości estrogenów w układzie krążenia. Wątroba ma jednak zdolność syntezy i wydzielania VTG w reakcji na egzogenną stymulację estrogenem (3) (4) (5).
4. Pomiar VTG służy wykrywaniu substancji chemicznych o estrogennym, antyestrogennym i androgenym charakterze działania oraz substancji chemicznych, które interferują ze steroidogenezą, na przykład inhibitorów aromatazy. Wykrycie estrogennych substancji chemicznych jest możliwe dzięki pomiarowi indukcji VTG u samców ryb i zostało bogato udokumentowane w recenzowanej literaturze naukowej. Indukcję VTG wykazano również po narażeniu na aromatyzowalne androgeny (6) (7). Obniżenie poziomu estrogenów w układzie krążenia w przypadku samic, na przykład na skutek zahamowania aktywności aromatazy przekształcającej endogenne androgeny w naturalny estrogen 17 β -estradiol, powoduje zmniejszenie stężenia VTG, co wykorzystuje się do wykrywania substancji chemicznych działających jak inhibitory aromatazy lub, ogólniej, do wykrywania inhibitorów steroidogenezy (33). Biologiczne znaczenie reakcji VTG po zahamowaniu aktywności substancji

estrogennej/aromatazy zostało ustalone i jest szeroko udokumentowane (8) (9). Możliwe jest jednak, że na wytwarzanie VTG u samic może również wpływać ogólna toksyczność i niehormonalne sposoby działania toksycznego.

5. Opracowano i znormalizowano z dobrym wynikiem kilka metod pomiaru w celu rutynowego wykorzystywania do ilościowego oznaczania VTG w próbkach krwi, wątroby, całego ciała lub homogenatów głowy/ogona pobranych od pojedynczych ryb. Dotyczy to danio przegowanego, ciernika i ryżanki japońskiej oraz częściowo zweryfikowanego gatunku *Pimephales promelas*; dostępne są metody oparte na właściwym dla danego gatunku teście immunoenzymatycznym (ELISA), w których do oznaczenia ilościowego VTG wykorzystuje się metody immunochemiczne (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). W przypadku ryżanki japońskiej i danio przegowanego występuje dobra korelacja między VTG mierzoną w próbkach osocza krwi, wątroby i homogenatów, mimo że homogenaty zwykle wykazują nieco niższe wartości niż osocze (17) (18) (19). W dodatku 5 przedstawiono zalecane procedury pobierania próbek do celów analizy VTG.
6. Zmiana w fenotypowej proporcji płci stanowi parametr docelowy odzwierciedlający odwrócenie płci. W zasadzie estrogeny, antyestrogeny, androgeny, antyandrogeny i substancje chemiczne hamujące steroidogenezę mogą mieć wpływ na proporcję płci rozwijających się ryb (20). Wykazano, że odwrócenie płci jest częściowo odwracalne w przypadku danio przegowanego (21) po narażeniu na działanie substancji chemicznej podobnej do estrogenu, natomiast odwrócenie płci po narażeniu na działanie substancji chemicznej podobnej do androgenu jest trwałe (30). Płeć definiuje się jako żeńską, męską, interseksualną (w jednej gonadzie znajdują się zarówno oocyty, jak i komórki spermatogenezy) lub niezróżnicowaną; u pojedynczych osobników określa się ją na podstawie histologicznego badania gonad. Wytyczne zostały zamieszczone w dodatku 7 i wytycznej OECD dotyczącej diagnozy histopatologii gonad ryb powiązanej z układem hormonalnym (*Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads*) (22).
7. Płeć genetyczną bada się za pośrednictwem markerów genetycznych, jeżeli występują one u danego gatunku ryb. W przypadku ryżanki japońskiej geny żeńskie XX lub męskie XY można wykryć za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) lub analizy związanej z genem Y zawierającym domenę DM (DMY) zgodnie z opisem w (23) (24) (DMY negatywny lub pozytywny). W przypadku ciernika istnieje równoważna metoda PCR określania płci genetycznej, którą opisano w dodatku 10. W przypadku gdy płeć genetyczną można połączyć indywidualnie z płcią fenotypową, moc badania zwiększa się i w związku z tym płeć genetyczną należy określać u gatunków o udokumentowanych markerach płci genetycznej.
8. Dwa podstawowe punkty końcowe wpływające na układ hormonalny, VTG i proporcja płci, mogą łącznie wskazywać na hormonalny charakter działania substancji chemicznej (zob. tabela 1). Proporcja płci stanowi biomarker istotny dla populacji (25) (26), a w przypadku dobrze znanego charakteru działania niektórych substancji wyniki badania rozwoju płciowego ryb można wykorzystać do oceny zagrożenia i ryzyka, jeżeli organ regulacyjny uzna to za właściwe. Taki charakter działania mają obecnie estrogeny, androgeny i inhibitory steroidogenezy.

Tabela 1

Reakcja punktów końcowych wpływających na układ hormonalny na różne charaktery działania substancji chemicznych.

↑ = podwyższenie, ↓ = obniżenie, — = nie zbadano

CHARAKTER DZIAŁANIA	VTG ♂	VTG ♀	Proporcja płci	Bibliografia
Słaby agonista estrogenu	↑	↑	↑♀ lub ↑Niezróżn.	(27) (40)
Silny agonista estrogenu	↑	↑	↑♀ lub ↑Nieróżn., Brak ♂	(28) (40)
Antagonista estrogenu	—	—	↓♀, ↑Niezróżn.	(29)
Agonista androgenu	↓ lub —	↓ lub —	↑ ♂, Brak ♀	(28) (30)
Agonista androgenu	—	—	↑♀ ↑Interseks.	(31)
Inhibitor aromatazy	↓	↓	↓♀	(33)

9. Badanie rozwoju płciowego ryb nie obejmuje fazy rozmnażania ryb, w związku z czym substancje chemiczne, co do których zachodzi podejrzenie, że mają wpływ na rozmnażanie przy stężeniach niższych niż stężenia wpływające na rozwój płciowy, należy poddać badaniu, które obejmuje rozmnażanie.
10. Definicje dla potrzeb niniejszej metody badawczej przedstawiono w dodatku 1.
11. Badanie rozwoju płciowego ryb *in vivo* ma na celu wykrycie substancji chemicznych o właściwościach androgennych i estrogennych, jak również antyandrogennych, antyestrogennych i hamujących steroidogenezę. Etapy weryfikacji w badaniu rozwoju płciowego ryb (1 i 2) faktycznie obejmowały substancje chemiczne estrogenne, androgenne i hamujące steroidogenezę. Oddziaływania antagonistów estrogenu i androgenu na rozwój płciowy ryb przedstawiono w tabeli 1, jednak te charakterystyki działania są obecnie w mniejszym stopniu udokumentowane.

ZASADA BADANIA

12. Badanie polega na narażaniu ryb od zapłodnionej komórki jajowej do zakończenia różnicowania płci na co najmniej trzy stężenia badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w wodzie. Badanie powinno się wykonywać w warunkach przepływu, chyba że jest to niemożliwe ze względu na dostępność lub charakter (np. ograniczoną rozpuszczalność) badanej substancji chemicznej. Badanie zaczyna się od umieszczenia świeżo zapłodnionych komórek jajowych (przed bruzdkowaniem tarczy zarodkowej) w komorach badawczych. Obciążenie komór opisano w pkt 27 w odniesieniu do każdego gatunku. W przypadku zweryfikowanych gatunków ryb, t.j. ryżanki japońskiej, ciernika i danio przegowanego, badanie kończy się 60 dni po wykluciu. Na zakończenie badania wszystkie ryby poddaje się eutanazji w sposób humanitarny. Z każdej ryby pobiera się próbki biologiczne (osocza krwi, wątroby lub homogenatu głowy/ogona) do analizy stężenia witellogeniny (VTG), pozostałą część utrzuwa się natomiast w celu wykonania oceny histologicznej gonad i określenia płci fenotypowej; nieobowiązkowo można przeprowadzić histopatologię (np. określenie etapu rozwoju gonad, intensywność interseksualności). Biologiczną próbkę (płetwę odbytową lub grzbietową) na potrzeby określenia płci genetycznej pobiera się od gatunków posiadających odpowiednie markery (dodatki 9 i 10).
13. Przegląd właściwych warunków badania specyficznych dla zweryfikowanych gatunków, t.j. ryżanki japońskiej, ciernika i danio przegowanego, podano w dodatku 2.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

14. Powinny być dostępne wyniki badania toksyczności ostrej lub innego krótkoterminowego badania toksyczności (np. metodą badania C.14 (34) w oparciu o wytyczną OECD 210 w sprawie badań (1)), najlepiej przeprowadzonego na gatunkach wybranych do tego badania. Oznacza to, że rozpuszczalność w wodzie i prężność par badanej substancji chemicznej powinny być znane, jak również powinna być dostępna niezawodna analityczna metoda oznaczania ilościowego substancji w komorach badawczych o udokumentowanej dokładności i granicy wykrywalności.
15. Inne użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny, czystość substancji, stabilność w wodzie i pod wpływem światła, stałą dysocjacji, współczynnik podziału n-oktanol/woda oraz wyniki badania szybkiej biodegradowalności (zob. metoda badania C.4) (35).

Kryteria akceptacji badania

16. Aby wyniki badania były akceptowalne, muszą zostać spełnione następujące warunki:
 - stężenie tlenu rozpuszczonego musi wynosić co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem (ASV) w trakcie badania;
 - różnica temperatury wody między komorami badawczymi przez cały czas trwania badania nie może być większa niż $\pm 1,5$ °C i musi być utrzymywana w zakresie temperatur określonym w odniesieniu do gatunków badanych (dodatek 2);
 - powinna być dostępna zweryfikowana metoda analizy narażenia na działanie substancji chemicznej, której granica wykrywalności znajduje się znacznie poniżej najniższego nominalnego stężenia; należy również zebrać dowody, aby wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze można było utrzymać w granicach ± 20 % średnich zmierzonych wartości;

- ogólna liczba zapłodnionych komórek jajowych, które przeżyły w próbach kontrolnych i, w uzasadnionych przypadkach, w próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem, powinna być większa niż wartości graniczne określone w dodatku 2 lub im równa;
- kryteria akceptacji związane z wzrostem i proporcjami płci na zakończenie badania są oparte na danych z grup kontrolnych (połączonych prób kontrolnych z rozpuszczalnikiem i wodą lub, jeśli znacznie się różnią, tylko z rozpuszczalnikiem):

		Ryżanka japońska	Danio przegowany	Ciernik
Wzrost	Mokra masa ryb osuszonych na bibule	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Długość (długość standardowa)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Proporcja płci (% samców i samic)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

- W przypadku stosowania rozpuszczalnika nie powinien on mieć istotnego statystycznie wpływu na przeżywalność i nie powinien zaburzać równowagi układu hormonalnego lub wykazywać innych szkodliwych skutków na wczesnych etapach życia, jak wykazano w próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem.

Jeżeli zaobserwuje się odchylenie od kryteriów akceptacji badania, skutki należy zanalizować w odniesieniu do wiarygodności danych badania, a analizy te należy uwzględnić w sprawozdaniu.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Komory badawcze

- Można użyć komór wykonanych ze szkła, stali nierdzewnej lub innych obojętnych chemicznie materiałów. Wymiary komór muszą być na tyle duże, aby zapewnić zgodność z podanymi poniżej kryteriami wskaźnika obciążenia. Zaleca się losowe rozmieszczenie komór badawczych w obszarze badania. Projekt z blokowym układem losowym, przy czym w każdym bloku występuje każde stężenie, jest korzystniejszy niż całkowicie losowy układ. Komory badawcze powinny być zabezpieczone przed niepożądanymi zakłóceniami.

Wybór gatunków

- Zalecane gatunki ryb wymieniono w dodatku 2. Procedury włączenia nowych gatunków podano w pkt 2.

Utrzymywanie ryb rodzicielskich

- Szczegółowe informacje dotyczące utrzymania ryb rodzicielskich w zadowalających warunkach można znaleźć w wytycznej OECD nr 210 w sprawie badań (1). Ryby rodzicielskie należy karmić odpowiednim pokarmem raz lub dwa razy dziennie.

Postępowanie z zarodkami i larwami

- Początkowo zarodki i larwy poddawane są narażeniu w obrębie głównej komory, w mniejszych komorach ze szkła lub stali nierdzewnej, wyposażonych w siatki po bokach lub na końcach, pozwalające na przepływ badanej substancji chemicznej przez komorę. Nieburzliwy przepływ przez te małe komory można uzyskać, zawieszając je na ramieniu przemieszczającym komory w górę i w dół, przy czym organizmy powinny być zawsze zanurzone.
- W przypadku gdy do utrzymywania komórek jajowych wewnątrz głównej komory badawczej używane były pojemniki, kraty lub siatki, należy usunąć te ograniczenia po wylęgu larw, poza zachowaniem siatek zapobiegających ucieczce ryb. Jeśli zachodzi konieczność przeniesienia larw, nie można ich wystawiać na działanie powietrza i nie wolno używać siatek do wypuszczania ryb z pojemników z komórkami jajowymi. Moment takiego przeniesienia zależy od gatunku i przeniesienie nie zawsze jest konieczne.

Woda

22. Woda, w której badane gatunki w próbie kontrolnej przeżywają co najmniej w tak dobrym stopniu jak w wodzie opisanej w dodatku 3, może być stosowana jako woda do badań. Powinna mieć stałą jakość w okresie trwania badania. Aby upewnić się, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbyt mocno na wyniki badania (np. wchodząc w reakcję z badaną substancją chemiczną) lub nie miała niekorzystnego wpływu na stado macierzyste, należy okresowo pobierać próbki wody do analizy. W przypadku gdy wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy mierzyć, np. co trzy miesiące, zawartość całkowitego węgla organicznego, przewodność właściwą, pH i zawiesinę ogólną. Pomiarów pod kątem zawartości metali ciężkich (takich jak Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) i pestycydów należy wykonać, jeżeli jakość wody budzi wątpliwości. Szczegóły dotyczące analizy chemicznej i pobierania wody można znaleźć w pkt 34.

Roztwory do badań

23. Jeżeli jest to praktycznie możliwe, należy zastosować system przepływowy. W przypadku badań przepływowych niezbędny jest system ciągłego dozowania i rozcieńczania roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej (np. pompa dozująca, układ rozcieńczania proporcjonalnego, układ saturatora) do przesyłania szeregu stężeń do komór badawczych. Natężenia przepływów roztworów podstawowych i wody rozcieńczającej muszą być sprawdzane okresowo w trakcie badania i nie mogą różnić się w trakcie badania o więcej niż o 10 %. Za odpowiedni uznano natężenie przepływu równoważne co najmniej pięciu objętościom komory badawczej na 24 godziny (1). Należy starać się unikać stosowania rur z tworzywa sztucznego lub innych materiałów, które mogą zwierać aktywne biologicznie substancje chemiczne lub mogą adsorbować badaną substancję chemiczną.
24. Zaleca się przygotowanie roztworu podstawowego bez stosowania rozpuszczalników przez zwykłe wymieszanie lub zbełtanie badanej substancji chemicznej w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. za pomocą mieszadła lub ultradźwięków). Jeżeli badana substancja chemiczna trudno rozpuszcza się w wodzie, należy postępować zgodnie z procedurami opisanymi w wytycznej OECD dotyczącej badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (*Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (36). Należy unikać stosowania rozpuszczalników, choć czasem może to być niezbędne w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Przykłady odpowiednich rozpuszczalników podano w (36).
25. Należy unikać półstatycznych warunków badania, jeżeli nie przedstawia się uzasadnienia opartego na przekonujących powodach związanych z badaną substancją chemiczną (np. stabilność, ograniczona dostępność, wysokie koszty lub zagrożenie). W odniesieniu do techniki półstatycznej można przyjąć dwie różne procedury wymiany. Nowe roztwory do badań są przygotowywane w czystych komorach, a komórki jajowe i larwy, które przeżyły, są ostrożnie przenoszone do nowych komór, albo organizmy użyte do badań są utrzymywane w komorach badawczych, a część (co najmniej dwie trzecie) wody badawczej jest codziennie zmieniana.

PROCEDURA**Warunki narażenia na działanie substancji***Pobieranie komórek jajowych i czas trwania*

26. Aby uniknąć błędów genetycznych, komórki jajowe pobiera się od co najmniej trzech par lub grup hodowlanych, zmieszanych i wybranych losowo w celu rozpoczęcia badania. W przypadku ciernika zobacz opis sztucznego zapłodnienia w dodatku 11. Badanie powinno rozpocząć się jak najszybciej po zapłodnieniu komórek jajowych i nie później niż 12 godzin po zapłodnieniu, przy czym zarodki powinny zostać zanurzone w roztworach do badań przed rozpoczęciem stadium bruzdkowania tarczki zarodkowych. Badanie należy kontynuować do momentu zakończenia różnicowania płci w grupie kontrolnej (60 dni po wykluciu w przypadku ryżanki japońskiej, ciernika i danio przegowanego).

Obciążenie

27. Liczba zapłodnionych komórek jajowych na początku badania powinna wynosić co najmniej 120 na stężenie i powinna być rozdzielona na co najmniej 4 kontrpróby (dopuszcza się pierwiastkowy przydział do próby kontrolnej). Komórki jajowe należy rozmieścić losowo (z wykorzystaniem tabel statystycznych do randomizacji) między zabiegami. Wskaźnik obciążenia (zob. definicja w dodatku 1) powinien być wystarczająco niski, aby można było utrzymać stężenie rozpuszczonego tlenu na poziomie co najmniej 60 % ASV bez bezpośredniego napowietrzania komór. W odniesieniu do badań przepływowych zaleca się stosowanie wskaźnika obciążenia nieprzekraczającego 0,5 g/l na 24 godziny i nieprzekraczającego w żadnym momencie 5 g/l roztworu. Nie później niż po 28 dniach od zapłodnienia należy ponownie rozdzielić liczbę ryb przypadającą na kontrpróbę, tak aby każda kontrpróba zawierała jak najbardziej zbliżoną liczbę ryb. W przypadku wystąpienia śmiertelności związanej z narażeniem należy odpowiednio zmniejszyć liczbę kontrprób, aby utrzymywać jak najbardziej zbliżone zagęszczenie ryb między poziomami zabiegowymi.

Światło i temperatura

28. Fotoperiod i temperatura wody muszą być odpowiednie dla badanego gatunku (zob. dodatek 2 dotyczący warunków doświadczalnych w odniesieniu do badania rozwoju płciowego ryb).

Karmienie

29. Pokarm i karmienie mają decydujące znaczenie, a podanie odpowiedniej karmy na każdym etapie w odpowiednich odstępach czasu i w ilości wystarczającej do utrzymania prawidłowego wzrostu ma zasadnicze znaczenie. Należy podawać pokarm bez ograniczeń przy jednoczesnym minimalizowaniu nadwyżek. Aby uzyskać wystarczające tempo wzrostu, ryby należy karmić co najmniej dwa razy dziennie (dopuszczając podawanie karmy raz dziennie w weekendy) w co najmniej trzygodzinnych odstępach czasu. Nadwyżkę pokarmu i ekskrementy należy usuwać, aby zapobiec akumulacji odpadów. Pokarm i schemat żywienia są stale udoskonalane w miarę zdobywania doświadczenia, aby poprawić przeżywalność i zoptymalizować wzrost. Należy zatem podjąć starania, aby proponowany schemat został potwierdzony przez uznanych ekspertów. Na 24 godziny przed zakończeniem badania należy zaprzestać podawania pokarmu. Przykłady odpowiednich rodzajów pokarmu wymieniono w dodatku 2 (zob. również wytyczną OECD dotyczącą badania ryb (Fish Testing Framework) (39)).

Badane stężenia

30. Rozkład stężeń badanych substancji chemicznych powinien być zgodny z opisem w dodatku 4. Należy zastosować co najmniej trzy badane stężenia w co najmniej czterech kontrpróbach. Przy wyborze zakresu badanych stężeń w badaniach toksyczności ostrej należy wziąć pod uwagę krzywą zależności średniego śmiertelnego stężenia LC_{50} od okresu narażenia. Jeżeli dane mają być wykorzystane do oceny ryzyka, zaleca się użycie pięciu badanych stężeń.
31. Stężenia substancji chemicznej wyższe niż 10 % LC_{50} dla osobników dorosłych lub 10 mg/l, w zależności od tego, która z tych wartości jest niższa, nie wymagają badania. Maksymalne badane stężenie powinno wynosić 10 % LC_{50} w larwalnym/młodocianym stadium życia.

Próby kontrolne

32. Oprócz badanych stężeń należy wykonać próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą (≥ 4 kontrpróby) i, w stosownych przypadkach, próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem (≥ 4 kontrpróby). W badaniu należy wykorzystywać wyłącznie rozpuszczalniki, co do których sprawdzono, że nie mają istotnie statystycznego wpływu na badane punkty końcowe.
33. W przypadkach gdy używa się rozpuszczalnika, jego końcowe stężenie nie powinno być większe niż 0,1 ml/l (36) i powinno być takie samo we wszystkich komorach badawczych, z wyjątkiem próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą. Należy jednak dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć użycia takich rozpuszczalników lub utrzymać stężenie rozpuszczalnika na minimalnym poziomie.

Częstotliwość oznaczeń i pomiarów analitycznych

34. Analizę chemiczną stężenia badanej substancji chemicznej należy przeprowadzić przed rozpoczęciem badania, aby sprawdzić zgodność z kryteriami akceptacji. Wszystkie kontrpróby należy analizować oddzielnie na początku i na końcu badania. W trakcie badania należy analizować jedną kontrpróbę na każde badane stężenie co najmniej raz na tydzień, zmieniając systematycznie kontrpróby (1,2,3,4,1,2,...). Jeżeli próbki przechowywane są w celu późniejszej analizy, należy wcześniej zweryfikować metodę przechowywania. Próbkę należy przefiltrować (np. przez filtr z porami o średnicy 0,45 μm) lub odwirować, aby mieć pewność, że oznaczenia substancji chemicznej zostaną wykonane w prawdziwym roztworze.
35. Podczas badania we wszystkich komorach badawczych należy mierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu, pH, twardość ogólną, przewodność właściwą, zasolenie (w stosownych przypadkach) i temperaturę. Stężenie rozpuszczonego tlenu, zasolenie (w stosownych przypadkach) i temperaturę należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu, a pH, przewodność właściwą i twardość wody na początku i na końcu badania. Zalecane jest stałe monitorowanie temperatury w co najmniej jednej komorze badawczej.
36. Zaleca się, aby wyniki oparte były na mierzonych stężeniach. Jeżeli jednak stężenie badanej substancji chemicznej w roztworze można bez problemów utrzymywać w zakresie ± 20 % nominalnego stężenia przez okres badania, wówczas wyniki mogą być oparte albo na wartościach nominalnych, albo na mierzonych.

Monitorowanie i pomiary*Stadium rozwoju zarodkowego*

37. Narażenie powinno rozpocząć się jak najszybciej po zapłodnieniu i przed rozpoczęciem stadium bruzdkowania tarczki zarodkowych oraz nie później niż 12 godzin po zapłodnieniu, aby zapewnić narażenie w trakcie wczesnego rozwoju zarodkowego.

Wylęg i przeżywalność

38. Obserwacje wylęgania i przeżywalności należy prowadzić co najmniej raz dziennie, a liczby należy odnotowywać. Martwe zarodki, larwy i młode ryby należy usunąć bezzwłocznie po ich zauważeniu, ponieważ mogą szybko ulec rozkładowi i rozdrobnieniu w wyniku działań innych ryb. Należy zachować najwyższą ostrożność przy usuwaniu martwych osobników, aby nie uderzyć lub nie uszkodzić fizycznie sąsiednich komórek jajowych/larw, które są bardzo delikatne i wrażliwe. Kryteria dotyczące zgonu zmieniają się stosownie do stadium życia:
- w odniesieniu do komórek jajowych: szczególnie we wczesnych stadiach znacząca utrata przezroczystości i zmiana w zabarwieniu spowodowane przez koagulację lub strącania białek, powodujące, że komórki jajowe przybierają białą barwę i stają się mętne;
 - w odniesieniu do larw i młodych ryb: bezruch, brak ruchu oddechowego, brak bicia serca lub białe matowe zabarwienie ośrodkowego układu nerwowego, lub brak reakcji na bodźce mechaniczne.

Nietypowy wygląd

39. Należy odnotować liczbę larw lub ryb charakteryzujących się nietypową budową ciała oraz opisać wygląd i naturę anomalii. Należy zauważyć, że występowanie nietypowych zarodków i larw jest naturalne i w próbach kontrolnych ich udział może wynosić kilka procent u niektórych gatunków. Nietypowe zwierzęta należy usunąć z komór badawczych dopiero po ich śmierci. Zgodnie jednak z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych, jeżeli anomalie prowadzą do bólu, cierpienia, stresu lub trwałego uszkodzenia, a śmierć można w wiarygodny sposób przewidzieć, zwierzęta należy znieczulić i uśmiercić zgodnie z opisem w pkt 44 i traktować jako przypadki śmiertelne do celów analizy danych.

Nietypowe zachowanie

40. Należy odnotować anomalie, np. hiperwentylację, nieskoordynowane pływanie, nietypowy spokój i nietypowe zachowania podczas pobierania pokarmu, z chwilą ich pojawienia się.

Masa

41. Na koniec badania wszystkie pozostałe przy życiu ryby należy uśmiercić (znieczulić jeżeli konieczne jest pobranie próbek krwi) oraz zważyć mokrą masę poszczególnych ryb (osuszonych na bibule).

Długość

42. Na końcu badania należy zmierzyć długość poszczególnych ryb (standardową długość).
43. Obserwacje te skutkować będą zebraniem niektórych lub wszystkich następujących danych do sprawozdania:
- skumulowana śmiertelność;
 - liczba zdrowych ryb pod koniec badania;
 - moment rozpoczęcia wylęgu i jego zakończenia;
 - długość i waga zwierząt, które przeżyły;
 - liczba zdeformowanych larw;
 - liczba ryb cechujących się nietypowym zachowaniem.

Pobieranie próbek ryb

44. Próbkę ryb pobiera się jest w momencie zakończenia badania. Ryby, z których pobiera się próbki, należy uśmiercić za pomocą np. MS-222 (100–500 mg na litr zbuforowanego 200 mg NaHCO_3 na litr) lub FA-100 (2-metoksy-4-allylofenol: eugenol) oraz zmierzyć i zważyć mokrą masę poszczególnych ryb (osuszonych na bibule), lub je znieczulić, jeżeli konieczne jest pobranie próbek krwi (zob. pkt 49).

Pobieranie próbek w celu przeprowadzenia badania VTG i określenia płci metodą oceny histologicznej

45. Należy pobrać próbki wszystkich ryb i przygotować je do badania VTG i określenia płci. Wszystkie ryby należy poddać badaniu histologicznemu w celu określenia płci. W przypadku pomiarów VTG akceptuje się pobranie podpróbek z co najmniej 16 ryb z każdej kontrpróby. Jeżeli wyniki uzyskane z podpróbek okażą się niejasne, należy zbadać więcej ryb pod kątem VTG.
46. Procedura pobierania próbek w celu określenia VTG i płci zależy od metody analizy VTG:

Metoda z wykorzystaniem homogenatu głowy/ogona w celu analizy VTG

47. Rybę uśmierca się. Głowę i ogon każdej z ryb oddziela się od tułowia przez nacięcia wykonane bezpośrednio za płetwami piersiowymi i bezpośrednio za płetwą grzbietową za pomocą skalpela (zob. rys. 1). Głowę i ogon każdej z ryb waży się razem, nadaje indywidualny numer, zamraża w ciekłym azocie i przechowuje w temperaturze – 70 °C lub niższej w celu przeprowadzenia badania VTG. Część tułowia ryby numeruje się i umieszcza w odpowiednim środku utrwalającym w celu przeprowadzenia oceny histologicznej (22). Dzięki wykorzystaniu tej metody badanie VTG i histopatologię przeprowadza się w odniesieniu do każdej ryby, a ewentualne zmiany poziomu VTG można w związku z tym odnieść do płci fenotypowej lub płci genetycznej ryby (np. w przypadku ryżanki japońskiej i ciernika). W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z wytycznymi dotyczącymi homogenizacji (dodatek 5) i wytycznymi dotyczącymi oznaczania ilościowego VTG (dodatek 6).

Metoda z wykorzystaniem homogenatu wątroby w celu analizy VTG

48. Rybę uśmierca się. Wątrobę wycina się i przechowuje w temperaturze – 70 °C lub niższej. Procedury zalecane przy wycinaniu wątroby i jej wstępnej obróbce można znaleźć w wytycznej OECD nr 229 w sprawie badań (37) lub rozdziale C.37 niniejszego załącznika (38). Wątroby poddaje się następnie oddzielnie procesowi homogenizacji opisanemu w wytycznej OECD nr 229 w sprawie lub rozdziale C.37 niniejszego załącznika. Zgromadzony supernatant wykorzystuje się w celu pomiaru VTG za pomocą homologicznej metody ELISA (zob. dodatek 6 zawierający przykład oznaczania ilościowego w odniesieniu do danio przegowanego lub wytyczna OECD nr 229 w sprawie badań (37) w odniesieniu do ryżanki japońskiej). W przypadku zastosowania tego podejścia można również uzyskać dane dotyczące zarówno poziomu VTG, jak i histologii gonad w odniesieniu do poszczególnych ryb.

Metoda z wykorzystaniem osocza krwi w celu analizy VTG

49. Krew pobiera się od znieczulonej ryby przez nakłucie serca, nacięcie żyły ogonowej lub ogona i odwirowuje w temperaturze 4 °C w celu zgromadzenia osocza. Do momentu wykorzystania osocze przechowuje się w temperaturze – 70 °C lub niższej. Rybę uśmierca się i umieszcza w substancji utrwalającej w celu przeprowadzenia histologii. Zarówno próbkom osocza, jak i rydom nadaje się indywidualne numery w celu odniesienia poziomów VTG do płci ryby.

Rysunek 1**Sposób cięcia ryby w celu pomiaru VTG w homogenacie głowy/ogona i w celu histologicznej oceny części środkowej.**

Określanie płci genetycznej

50. Biologiczną próbkę służącą do określenia płci genetycznej pobiera się od pojedynczych osobników z gatunku posiadającego odpowiednie markery. W przypadku ryżanki japońskiej pobiera się płetwę odbytową lub płetwę grzbietową. Szczegółowy opis, obejmujący pobieranie próbek tkanek i określanie płci metodą PCR przedstawiono w dodatku 9. Również w przypadku ciernika opis pobierania próbek tkanek i określenia płci metodą PCR przedstawiono w dodatku 10.

Pomiar VTG

51. Pomiar VTG należy wykonać metodą zweryfikowaną pod względem ilościowym i analitycznym. Informacje powinny być dostępne po wykonaniu wewnątrz- i międzylaboratoryjnego oznaczenia zmienności metody stosowanej w danym laboratorium. Przyczyną wewnątrz- i międzylaboratoryjnej zmienności są (najprawdopodobniej) różne stadia rozwojowe populacji ryb. Biorąc pod uwagę zmienność w pomiarze VTG, NOEC określone w oparciu o tylko ten punkt końcowy należy traktować z wielką ostrożnością. Dostępne są różne metody oceny wytwarzania VTG w przypadku gatunków ryb zastosowanych w tym badaniu. Metodą pomiaru, która jest zarówno stosunkowo czuła, jak i swoista, jest oznaczenie stężeń białka za pośrednictwem testu immunoenzymatycznego (ELISA). Należy wykorzystać homologiczne przeciwciała (wytworzone w reakcji na VTG tego samego gatunku) i najważniejsze homologiczne standardy.

Określania płci

52. W zależności od procedury pobierania próbek w celu określenia VTG całą rybę lub pozostałą środkową część każdej z ryb umieszcza się w specjalnie wcześniej oznakowanej kasetce i utrzuwa w środku utrwalającym w celu histologicznego określenia płci (opcjonalnie również w celu określenia etapu rozwoju gonad). Wytyczne dotyczące utrwalania i zatapiania przedstawione zostały w dodatku 7 i w wytycznej OECD dotyczącej diagnozowania histopatologii gonad ryb związanej z układem hormonalnym (*Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads*) (22). Po zakończeniu tej procedury ryby zatapia się w blokach parafinowych. Poszczególne osobniki należy umieścić wzdłużnie w bloku parafinowym. Od każdego osobnika pobiera się co najmniej sześć skrawków wzdłużnych (grubość 3–5 µm) w płaszczyźnie przedniej, w tym tkankę z obydwu gonad. Odstęp między skrawkami powinien wynosić około 50 µm w przypadku samców i 250 µm w przypadku samic. Ponieważ jednak każdy blok będzie często zawierał samce i samice (w przypadku gdy więcej osobników niż jeden zostało zatopione w każdym bloku) odstęp między skrawkami w tych blokach powinien wynosić około 50 µm aż do uzyskania co najmniej sześciu wycinków gonad od każdego samca. Następnie odstęp między skrawkami można zwiększyć do około 250 µm w przypadku samic. Skrawki barwi się z zastosowaniem hematoksyliny i eozyny oraz bada przy użyciu mikroskopu świetlnego, w szczególności pod kątem płci (żeńską, męską, interseksualną lub brak zróżnicowania). Płeć interseksualną definiuje się jako obecność więcej niż jednego oocytu w jądrach na sześć zbadanych skrawków lub komórki spermatogenezy (tak/nie) w jajnikach. Histopatologia gonad oraz określenie etapów rozwoju jajników i jąder są nieobowiązkowe, ale w przypadku poddania ich badaniu wyniki należy przeanalizować statystycznie i zamieścić w sprawozdaniu. Należy zauważyć, że u niektórych gatunków ryb naturalnym zjawiskiem jest brak w pełni rozwiniętej pary gonad i może występować tylko jedna gonada (np. w przypadku ryżanki japońskiej i niekiedy w przypadku dania przegowanego). Należy odnotowywać wszystkie tego typu obserwacje.
53. Określenie płci genetycznej w przypadku poszczególnych osobników ryżanki japońskiej opiera się na występowaniu lub braku genu określającego płeć męską DMY ryżanki, który jest zlokalizowany w chromosomie Y. Genetyczną płeć ryżanki można określić przez sekwencjonowanie genu DMY z DNA ekstrahowanego na przykład z kawałka płetwy odbytowej lub płetwy grzbietowej. Obecność DMY wskazuje na osobnika XY (samca) niezależnie od fenotypu, natomiast brak DMY wskazuje na osobnika XX (samicę) niezależnie od fenotypu (23). Wytyczne dotyczące preparowania tkanki i metody PCR przedstawiono w dodatku 9. Określanie płci genetycznej u poszczególnych osobników ciernika również wykonuje się z wykorzystaniem metody PCR opisanej w dodatku 10.
54. W sprawozdaniu należy podać występowanie osobników interseksualnych (zob. definicja w dodatku 1).

Drugorzędne cechy płciowe

55. U gatunków takich jak ryżanka japońska drugorzędne cechy płciowe są kontrolowane przez układ hormonalny, w związku z tym obserwacje fizycznego wyglądu ryb powinny, o ile to możliwe, zostać przeprowadzone pod koniec narażenia. W przypadku ryżanki japońskiej wykształcenie się brodawkowej zmiany na tylnej części płetwy odbytowej u samic jest spowodowane reakcją na androgeny. W rozdziale C.37 niniejszego załącznika (38) zamieszczone zostały odpowiednie zdjęcia drugorzędnych cech płciowych samców i androgenicznych samic.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

56. Ważne jest, aby punkt końcowy został określony przez ważny test statystyczny o największej mocy. Jednostkę eksperymentalną stanowi kontrpróba, ale w teście statystycznym uwzględnić należy zmienność między kontrpróbami. Blokowy schemat decyzyjny przedstawiony w dodatku 8 ma pomóc w zastosowaniu najodpowiedniejszego testu statystycznego na podstawie charakterystyki danych uzyskanych w badaniu. Statystyczny poziom istotności wynosi 0,05 w odniesieniu do wszystkich punktów końcowych.

Proporcje płci i płęć genetyczna

57. Proporcje płci należy przeanalizować pod kątem istotnego wpływu (podejście NOEC/LOEC) spowodowanego narażeniem za pomocą testu Jonckheere'a-Terpstry (test trendu), jeżeli istnieje monotoniczna zależność dawka-odpowiedź. Jeżeli stwierdzony zostanie brak monotoniczności, wówczas należy zastosować badanie porównań par. Jeżeli można uzyskać normalność rozkładu zmiennych i jednorodną wariancję, wykorzystuje się badanie Dunnetta. Jeżeli występuje niejednorodna wariancja, stosuje się test Tamhane'a-Dunnetta. W przeciwnym razie wykorzystuje się test Manna-Whitney'a skorygowany metodą Bonferroniego-Holma. Schemat blokowy przedstawiający statystykę proporcji płci znajduje się w dodatku 8. Proporcje płci należy przedstawić w tabelach jako proporcje stężenia $\pm$ SD (odchylenie standardowe) w odniesieniu do płci męskiej, żeńskiej, interseksualnej i niezróżnicowanej. Należy podkreślić poziom istotności. Przykłady można znaleźć w sprawozdaniu z weryfikacji badania rozwoju płciowego ryb fazy 2 (42). Płęć genetyczną należy podać jako odsetek odwróconej płci fenotypowej w odniesieniu do płci męskiej, żeńskiej, interseksualnej i niezróżnicowanej.

Stężenia VTG

58. Stężenia VTG należy przeanalizować pod kątem istotnego wpływu wywołanego narażeniem (podejście NOEC/LOEC). Lepiej jest zastosować test Dunnetta niż test t-Studenta z korektą Bonferroniego. W przypadku zastosowania korekty Bonferroniego zaleca się zastosowanie korekty metodą Bonferroniego-Holma. Należy uwzględnić przekształcenie logarytmiczne VTG w celu uzyskania normalności rozkładu zmiennych i jednorodności wariancji. Następnie, jeżeli zależność stężenie-odpowiedź jest stała i monotoniczna, lepiej jest zastosować test Jonckheere'a-Terpstry niż którykolwiek powyższych. Jeżeli zastosowano testy t-Studenta lub test Dunnetta, nie ma potrzeby stosowania analizy wariancji F w dalszym postępowaniu. Szczegóły opisano w schemacie znajdującym się w dodatku 8. Wyniki należy przedstawić w tabelach jako średnie stężenia $\pm$ SD (odchylenie standardowe) oddzielnie dla płci męskiej, żeńskiej, interseksualnej i niezróżnicowanej. Należy podkreślić poziom istotności w przypadku fenotypowych samic i fenotypowych samców. Przykłady można znaleźć w sprawozdaniu z weryfikacji badania rozwoju płciowego ryb fazy 2 (42).

Badana substancja chemiczna: stężenia rzeczywiste

59. Rzeczywiste stężenia badanej substancji chemicznej w komorach należy analizować z częstotliwościami opisanymi w pkt 34. Wyniki należy przedstawić w tabelach jako średnie stężenia $\pm$ SD (odchylenie standardowe) w odniesieniu do kontrprób, jak również w odniesieniu do stężeń z informacją dotyczącą liczby próbek i podkreśleniem wartości oddalonych od średniego stężenia zabiegu o $\pm 20\%$. Przykłady można znaleźć w sprawozdaniu z weryfikacji badania rozwoju płciowego ryb fazy 2 (42).

Interpretacja wyników

60. Wyniki badania należy ostrożnie interpretować w przypadku, gdy mierzone stężenia badanej substancji chemicznej w roztworach do badań oscylują na poziomie granicy wykrywalności metody analitycznej.

Sprawozdanie z badania

61. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- istotne właściwości fizykochemiczne; dane dotyczące tożsamości chemicznej, w tym czystości i metody analitycznej oznaczania ilościowego badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

- zastosowana procedura badawcza (np. przepływowa, badanie półstatyczne/wymiana); projekt badania obejmujący badane stężenia, metodę przygotowywania roztworów podstawowych (w załączniku), częstotliwość wymiany (jeżeli został zastosowany środek rozpuszczający, należy podać jego stężenie);
- badane stężenia nominalne, średnie mierzonych wartości oraz ich odchylenia standardowe w komorach badawczych, a także metoda uzyskania takich wartości (zastosowaną metodę analityczną należy przedstawić w załączniku); dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w prawdziwym roztworze;
- jakość wody w komorach badawczych: pH, twardość, temperatura i stężenie rozpuszczonego tlenu;
- szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, źródło, podana ilość i częstotliwość podawania oraz, w stosownych przypadkach, analiza pod kątem zanieczyszczeń (np. PCB, WWA oraz całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych)).

Wyniki

- dowody świadczące o tym, że próby kontrolne spełniają kryteria ważności: dane dotyczące wskaźnika wylęgu należy przedstawić w tabelach jako odsetek na kontrpróbę i na stężenie. Należy podkreślić wartości oddalone od kryteriów akceptacji (w próbach kontrolnych). Informacje dotyczące przeżywalności należy przedstawić jako odsetek przypadający na kontrpróbę i na stężenie. Należy podkreślić wartości oddalone od kryteriów ważności (w próbach kontrolnych);
 - jasno sformułowane informacje dotyczące wyników uzyskanych w odniesieniu do różnych zaobserwowanych punktów końcowych: przeżycie zarodków i skuteczny wylęg, anomalie w wyglądzie zewnętrznym, długość i masa, pomiary VTG (ng/g homogenatu, ng/ml osocza lub ng/mg wątroby), histologia gonad, proporcja płci, dane dotyczące płci genetycznej, przypadki wszystkich nietypowych reakcji ryb i wszystkie widoczne efekty spowodowane przez badaną substancję chemiczną.
62. Wyniki należy przedstawić jako średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe (SD) lub błąd standardowy (SE). Jako dane statystyczne należy podać co najmniej NOEC i LOEC oraz przedziały ufności. Należy postępować według statystycznego schematu blokowego (dodatek 8).

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, wytyczna nr 210 w sprawie badań, Wytyczne dotyczące badania substancji chemicznych, OECD, Paryż.
- (2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen i J.P. Sumpter, 1996, »Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals«, *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, s. 194-202.
- (3) Sumpter, J.P. i S. Jobling, 1995, Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment, *Environmental Health Perspectives* 103, s. 173-178.
- (4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix i 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, s. 337-347.
- (5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen i 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, s. 119-131.
- (6) Andersen, L., P. Bjerregaard i B. Korsgaard (2003), Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters, *Fish Physiology and Biochemistry* 28, s. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren i G.I. Petersen (2003), »Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone«, *Aquatic Toxicology* 65, s. 397-411.

- (8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, i C.R. Tyler (2002), »Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances«, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, s. 319-326.
- (9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, i 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, s. 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, s. 113-125.
- (11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr i 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, s. 1 699–1 708.
- (12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara i 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, s. 161-169.
- (13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James i 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, s. 311-326.
- (14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita i T. Iguchi (2004), Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka, *Journal of Health Science* 50, s. 301–308.
- (15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson i A. Goksoyr (2006), »Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*«, 78, s. 202-206.
- (16) Jensen, K.M. i G.T. Ankley (2006), »Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)«, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, s. 101-105.
- (17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L. i 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, s. 48-51.
- (18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher i A. Goksoyr (2004), »Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening«, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, s. 621-633.
- (19) Orn, S., S. Yamani i 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, s. 237–243.
- (20) Scholz, S. i N. Kluver (2009), Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, *Sexual Development* 3, s. 136–151.
- (21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers i H. Segner (2005), An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*, *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, s. 1 088–1 098.
- (22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paryż.
- (23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata i Y. Nagahama (2004), »Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*«, *Developmental Dynamics* 231, s. 518-526.

- (24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi i M. Sakaizumi (2004), »Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations«, *Zoological Science* 21, s. 613-619.
- (25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, i 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, s. 8897-8901.
- (26) Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, i K.A. Kidd (2009), »Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethinylestradiol added to a whole lake«, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, s. 1920-1935.
- (27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, i 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, s. 279-290.
- (28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren i P. Bjerregaard (2006), »Detection of endocrine disruptors: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)«, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, s. 57-66.
- (29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard i P. Bjerregaard (2004), Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disruptors: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*), *Fish Physiology and Biochemistry* 30, s. 257–266.
- (30) Morthorst, J.E., H. Holbech i P. Bjerregaard (2010), Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations, *Aquatic Toxicology* 98, s. 336–343.
- (31) Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch i C.D. Metcalf (2003), »Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)«, *Aquatic Toxicology* 63, s. 391-403.
- (32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, i 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, s. 11-21.
- (33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen i P. Bjerregaard (2007), »Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)«, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, s. 165-170.
- (34) Rozdział C.14 niniejszego załącznika, Badanie wzrostu młodych ryb.
- (35) Rozdział C.4 niniejszego załącznika, Szybka biodegradowalność.
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, OECD, Paryż.
- (37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, wytyczna nr 229 w sprawie badań, Wytyczne dotyczące badania substancji chemicznych, OECD, Paryż.
- (38) Rozdział C.37 niniejszego załącznika, 21-dniowe badanie ryb: krótkoterminowa analiza przesiewowa aktywności estrogennej i androgennej oraz zahamowania aktywności aromatazy.
- (39) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 171, OECD, Paryż.
- (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, s. 768-779.
- (41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paryż.

- (42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paryż.
 - (43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Seria dotycząca badań i oceny, nr 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paryż.
 - (44) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33.
-

Dodatek 1

Skróty i definicje

Szczytowy punkt końcowy: mający wpływ na poziomie populacji

ASV: wartość nasycenia powietrzem

Biomarker: mający wpływ na poziomie indywidualnym

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Dph: dni po wylęgu

DMY: gen Y domenny DM konieczny do rozwoju samców ryżanki japońskiej

ELISA: test immunoenzymatyczny

Masa ryb: mokra masa ryb (osuszonych na bibule)

FSDT: Badanie rozwoju płciowego ryb

Oś podwzgórze–przysadka–nadnercza: oś podwzgórze–przysadka–nadnercza

Ryba interseksualna: ryba posiadająca więcej niż jeden oocyt w jądrach na sześć zbadanych skrawków lub komórki spermatogeniczne w jajnikach (tak/nie)

Wskaźnik obciążenia: mokra masa ryb na objętość wody

MOA: charakter działania

RT-PCR: odwrotna transkrypcja z łańcuchową reakcją polimerazową

Badana substancja chemiczna: oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej

Ryba niezróżnicowana: ryba z gonadami bez widocznych komórek zarodkowych

VTG: witellogenina

Dodatek 2

Warunki badania rozwoju płciowego ryb (gatunki słodkowodne)

1. Zalecane gatunki	Ryżanka japońska (<i>Oryzias latipes</i>)	Danio przegowany (<i>Danio rerio</i>)	Ciernik (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Rodzaj badania	Przepływowe lub półstatyczne	Przepływowe lub półstatyczne	Przepływowe lub półstatyczne
3. Temperatura wody	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Jakość oświetlenia	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)
5. Natężenie światła	10–20 µE/m ² /s, 540–1 080 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 080 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 080 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)
6. Fotoperiod	12–16 godzin światła, 8–12 godzin ciemności	12–16 godzin światła, 8–12 godzin ciemności	16 godzin światła, 8 godzin ciemności
7. Minimalna wielkość komór	Pojedyncza komora powinna zawierać minimum 7 l wody	Pojedyncza komora powinna zawierać minimum 7 l wody	Pojedyncza komora powinna zawierać minimum 7 l wody
8. Liczba wymian objętości roztworów do badań	Minimum 5 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie
9. Wiek organizmów użytych do badania w momencie rozpoczęcia narażenia	Świeżo zapłodnione komórki jajowe (wczesne stadium blastuli)	Świeżo zapłodnione komórki jajowe (wczesne stadium blastuli)	Świeżo zapłodnione komórki jajowe (wczesne stadium blastuli)
10. Liczba komórek jajowych na zabieg	Minimum 120	Minimum 120	Minimum 120
11. Liczba zabiegów	Co najmniej 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	Co najmniej 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	Co najmniej 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)
12. Liczba kontrprób na zabieg	Co najmniej 4 (chyba że akceptuje się pierwiastkowy przydział do prób kontrolnych)	Co najmniej 4 (chyba że akceptuje się pierwiastkowy przydział do prób kontrolnych)	Co najmniej 4 (chyba że akceptuje się pierwiastkowy przydział do prób kontrolnych)
13. Schemat żywienia	Żywe <i>Artemia</i> , zamrożone dorosłe solowce, pokarm w płatkach itd. Zaleca się karmienie dwa razy dziennie	Specjalny pokarm dla narybku, żywe <i>Artemia</i> , zamrożone dorosłe solowce, pokarm w płatkach itd. Zaleca się karmienie dwa razy dziennie	Żywe <i>Artemia</i> , zamrożone dorosłe solowce, pokarm w płatkach itd. Zaleca się karmienie dwa razy dziennie

14. Napowietrzanie	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadnie poniżej 70 % nasycenia
15. Woda rozcieńczająca	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub woda regenerowana	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub woda regenerowana	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub woda regenerowana
16. Czas trwania narażenia na badaną substancję chemiczną	60 dni po wylęgu	60 dni po wylęgu	60 dni po wylęgu
17. Biologiczne punkty końcowe	Pozytywny wynik wylęgu, morfologia makroskopowa po przeżyciu, VTG histologia gonad, płęć genetyczna Proporcja płci	Pozytywny wynik wylęgu, przeżywalność Morfologia makroskopowa, VTG histologia gonad, proporcja płci	Pozytywny wynik wylęgu, przeżywalność Morfologia makroskopowa, VTG histologia gonad, proporcja płci
18. Kryteria dopuszczalności badania dla połączonych kontrprób prób kontrolnych	Pozytywny wynik wylęgu > 80 %	Pozytywny wynik wylęgu > 80 %	Pozytywny wynik wylęgu > 80 %
	Przeżywalność po wylęgu ≥ 70 %	Przeżywalność po wylęgu ≥ 70 %	Przeżywalność po wylęgu ≥ 70 %
	Wzrost (mokra masa ryb osuszonych na bibule) > 150 mg	Wzrost (mokra masa ryb osuszonych na bibule) > 75 mg	Wzrost (mokra masa ryb osuszonych na bibule) > 120 mg
	Długość (długość standardowa) > 20 mm	Długość (długość standardowa) > 14 mm	Długość (długość standardowa) > 20 mm
	Proporcja płci (% samców i samic) 30–70 %	Proporcja płci (% samców lub samic) 30–70 %	Proporcja płci (% samców lub samic) 30–70 %

Dodatek 3

Właściwości chemiczne akceptowalnej wody rozcieńczającej

SKŁADNIK	STĘŻENIE
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 mg/l
Chlor resztkowy	< 10 mg/l
Pestycydy fosforoorganiczne ogółem	< 50 ng/l
Pestycydy chloroorganiczne ogółem plus polichlorowane bifenyle	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

Dodatek 4

Na podstawie metody badawczej c.14 /wytyczne dotyczące badanych stężeń

Kolumna (liczba stężeń między 100 i 10 lub między 10 i 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

(*) Z kolumny można wybrać serię trzech (lub więcej) kolejnych stężeń. Średnie wartości między stężeniami w kolumnie (x) zostały podane w kolumnie (2x + 1). Poszczególne wartości przedstawiają stężenia wyrażone jako ułamek objętościowy lub ułamek masowy (mg/l lub µg/l). Wartości mogą być zwielokrotniane lub dzielone przez każdą potęgę liczby 10, stosownie do okoliczności. Kolumnę 1 można zastosować, jeśli istniała znaczna niepewność dotycząca poziomu toksyczności.

Dodatek 5

Wytyczne dotyczące homogenizacji głowy i ogona młodych osobników danio przegowanego, *Pimephales promelas*, ciernika i ryżanki japońskiej

Celem niniejszej części jest opisanie procedur poprzedzających ilościowe oznaczenie stężenia VTG. Można stosować inne procedury, których wynikiem jest porównywalne oznaczanie ilościowe VTG. Istnieje możliwość określenia stężenia VTG w osoczu krwi lub wątrobie zamiast w homogenacie głowy/ogona.

Procedura

1. Ryby znieczula się i uśmierca zgodnie z opisem badania.
2. Głowę i ogon ryb odcina się zgodnie z opisem badania. **Uwaga:** przyrządy do przeprowadzania sekcji i deskę do krojenia należy wypłukać i odpowiednio wyczyścić (np. za pomocą 96 % etanolu) przed obróbką każdej pojedynczej ryby w celu uniknięcia przeniesienia »zanieczyszczenia VTG« z samic lub samców, u których VTG występuje, na samce, które jej nie posiadają.
3. Łączną masę głowy i ogona każdej z ryb mierzy się z dokładnością do pełnego miligrama.
4. Po zważeniu tych części umieszcza się je w odpowiednich probówkach (np. probówkach Eppendorfa o pojemności 1,5 ml) i zamraża w temperaturze – 80 °C do czasu homogenizacji lub bezpośrednio poddaje homogenizacji z lodem za pomocą dwóch tłuczków z tworzywa sztucznego. (Zastosować można również inne metody, pod warunkiem że stosując je, używa się lodu i można uzyskać jednorodną masę). **Uwaga:** probówki należy odpowiednio ponumerować, tak by głowa i ogon danej ryby mogły zostać przypisane do odpowiadających im części ciała wykorzystywanych do histologii gonad.
5. Po uzyskaniu homogenicznej masy dodaje się 4–10-krotność wagi tkanki lodowatego **roztworu buforowego do homogenizacji** (*) (zwrócić uwagę na rozcieńczenie). Mieszaninę należy dalej rozdrabniać za pomocą tłuczków dopóki nie stanie się jednorodna. **Ważna uwaga:** do każdej ryby wykorzystuje się nowe tłuczki.
6. Próbkę umieszcza się z lodem aż do odwirowania w temp. 4 °C przy 50 000 g przez 30 min.
7. Użyć pipety do wprowadzenia porcji supernatantu o objętości 20–50 µl (zwrócić uwagę na ilość) do **co najmniej dwóch** probówek przez zanurzenie końcówki pipety pod znajdującą się na wierzchu warstwę tłuszczu i ostrożne zassanie supernatantu bez fragmentów tłuszczu lub grudek.
8. Do momentu wykorzystania probówki przechowuje się w temperaturze – 80 °C.

(*) *Roztwór buforowy do homogenizacji:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % koktajlu inhibitorów proteaz (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl koktajlu inhibitorów proteaz (lub odpowiednika koktajlu inhibitorów proteaz).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Koktajl inhibitorów proteaz: firmy Sigma (w przypadku tkanki ssaków), numer produktu **P 8340**.

Uwaga: roztwór buforowy do homogenizacji należy wykorzystać w tym samym dniu, w którym został sporządzony. Podczas stosowania należy umieścić go w lodzie.

Dodatek 6

Wytyczne dotyczące oznaczania ilościowego witellogeniny w homogenacie głowy i ogona w odniesieniu do danio przegowanego (*Danio rerio*) (METODA Holbecha i in., 2001, zmodyfikowana). można wykorzystać inne procedury z zastosowaniem homologicznych przeciwciał i standardów

1. Mikropłytki do miareczkowania (certyfikowane płytki Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Dania) powlekane wcześniej 5 µg/ml przeciwciał IgG przeciw lipowitelinie danio przegowanego płucze się i czyści trzy razy za pomocą roztworu buforowego do przemywania (*).
2. Standardowa ilość oczyszczonej witellogeniny pochodzącej od danio przegowanego ⁽¹⁾ rozcieńcza się seriami po 0,2, 0,5, 1, 5, 10 i 20 20 ng/ml w roztworze buforowym do rozcieńczania (**), a próbki rozcieńcza się co najmniej 200 razy (aby nie dopuścić do efektu matrycy) w roztworze buforowym do rozcieńczania i nakłada na płytki. Stosuje się podwójną próbę kontrolną. W każdym dołku umieszcza się 150 µl. Stosuje się podwójne wzorce i potrójne próbki. Próbkę inkubuje się przez całą noc w temperaturze 4 °C w wytrząsarce.
3. Płytki przemywa się pięć razy roztworem buforowym do przemywania (*).
4. HRP dołączona do łańcucha dekstranu (np. AMDEX A/S, Dania) i sprzężone przeciwciała rozcieńczane są w roztworze buforowym do przemywania; rzeczywisty stopień rozcieńczenia różni się w zależności od partii i wieku. W każdym dołku umieszcza się 150 µl i płytki inkubuje się przez godzinę w temperaturze pokojowej w wytrząsarce.
5. Płytki przemywa się pięć razy roztworem buforowym do przemywania (*), a dno płytek ostrożnie czyści się etanolem.
6. W każdym dołku umieszcza się 150 µl TMB plus (***). Należy chronić płytkę przed światłem za pomocą folii aluminiowej i obserwować zmianę koloru w wytrząsarce.
7. Po uzyskaniu pełnej krzywej wzorcowej działanie enzymów zatrzymuje się przez dodanie do każdego dołka 150 µl 0,2 M H₂SO₄.
8. Absorbancję mierzy się przy 450 nm (np. na czytniku płytek Molecular Devices Thermomax). Dane analizuje się za pomocą zintegrowanego oprogramowania (np. Softmax).

(*) Roztwór buforowy do przemywania:

roztwór podstawowy chlorku sodu buforowanego fosforanami (****)	500,0 ml

Roztwór wzorcowy albuminy surowicy bydłowej (BSA)	5,0 g

Tween 20	5,0 ml

Należy wyregulować pH do 7,3 i dopełnić do 5 l H₂O oczyszczoną w systemie Millipore. Roztwór należy przechowywać w temperaturze 4 °C.

(**) Roztwór buforowy do rozcieńczania:

roztwór podstawowy chlorku sodu buforowanego fosforanami (****)	100,0 ml

Roztwór wzorcowy albuminy surowicy bydłowej (BSA)	3,0 g

Tween 20	1,0 ml

Należy wyregulować pH do 7,3 i dopełnić do 1 l H₂O oczyszczoną w systemie Millipore. Roztwór należy przechowywać w temperaturze 4 °C.

⁽¹⁾ Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), oczyszczony zgodnie z: 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 to gotowy do zastosowania substrat wyprodukowany przez KemEnTec (Dania). Jest on wrażliwy na światło. Roztwór należy przechowywać w temperaturze 4 °C.

(****) Roztwór podstawowy chlorku sodu buforowanego fosforanami

NaCl	160,0 g

KH ₂ PO ₄	4,0 g

Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	26,6 g

KCl	4,0 g

Należy wyregulować pH do 6,8 i dopełnić do 2 l H₂O oczyszczonej w systemie Millipore. Roztwór należy przechowywać w temperaturze pokojowej.

Dodatek 7

Wytyczne dotyczące sporządzania preparatów skrawków tkanek do określenia płci i etapu rozwoju gonad

Celem niniejszej części jest opisanie procedur poprzedzających ocenę skrawków histologicznych. Można stosować inne procedury, których wynikiem jest podobne określenie płci i etapu rozwoju gonad.

Z kilkoma wyjątkami procedury te mają podobny charakter w odniesieniu do ryżanki japońskiej i danio przegowanego.

Uśmiercenie, autopsja i utrwalenie tkanek*Cele:*

1. Zapewnienie humanitarnego uśmiercania ryb.
2. Uzyskanie niezbędnych wartości wagi i pomiarów ciała.
3. Ocena drugorzędnych cech płciowych.
4. Wycięcie tkanek do analizy VTG.
5. Utrwalenie gonad.

Procedury:

1. Ryby należy uśmiercać tuż przed autopsją. W związku z tym nie należy uśmiercać kilku ryb naraz, jeżeli nie ma wystarczającej liczby osób dokonujących autopsji.
2. Ryby wyjmuje się z komory badawczej za pomocą małej siatki i przenosi w pojemniku transportowym na miejsce autopsji.
3. Ryby umieszcza się w roztworze do uśmiercania. Wyjmuje się je z roztworu, gdy nastąpi zatrzymanie oddechu i ryby nie reagują na bodźce zewnętrzne.
4. Ryby waży się na mokro.
5. W celu przygotowania tkanek do analizy VTG można umieścić rybę na korkowej podkładce na stoliku mikroskopu preparacyjnego.
 - a) W przypadku danio przegowanego głowę odcina się tuż za płetwą piersiową, a ogon tuż za płetwą grzbietową.
 - b) W przypadku ryżanki japońskiej jamę brzuszną otwiera się, wykonując ostrożnie nacięcie biegnące wzdłuż środkowej linii brzucha od obręczy barkowej do punktu znajdującego się tuż za odbytem. Ostrożnie usuwa się wątrobę za pomocą małych szczypczyków i małych nożyczek.
6. Próbkę do analizy VTG umieszcza się w probówkach Eppendorfa i natychmiast zamraża w ciekłym azocie.
7. Tuszę wraz z gonadami umieszcza się w oznakowanej wcześniej kasce z tworzywa sztucznego przeznaczonej na tkanki, którą przenosi się do utrwalacza Davidsona lub Bouina. Objętość utrwalacza powinna być co najmniej 10 razy większa niż przybliżona objętość tkanek. Pojemnik ze środkiem utrwalającym wstrząsa się delikatnie przez pięć sekund w celu usunięcia bąbelków powietrza z kasety.
8.
 - a) Wszystkie tkanki pozostawia się na noc w utrwalaczu Davidsona, a następnego dnia przenosi do pojedynczych pojemników z 10 % obojętną zbuforowaną formaliną. Pojemniki z kasetami wstrząsa się delikatnie przez pięć sekund, aby formalina należycie przeniknęła do kasetek.
 - b) Tkanki pozostają w utrwalaczu Bouina przez 24 godziny, a następnie przenoszone są do 70 % etanolu.

Postępowanie z tkankami

Cele:

1. Odwodnić tkankę, aby umożliwić należyte nasączenie parafiną.
2. Zaimpregnować tkankę parafiną w celu utrzymania spójności tkanki i stworzenia stabilnej powierzchni na potrzeby mikrotomii.

Procedury:

3. Oznakowane kasety z tkankami wyjmuje się z formaliny/etanolu i umieszcza w koszyczkach do obróbki. Koszyczki do obróbki umieszcza się w procesorze tkankowym.
4. Wybiera się program obróbki.
5. Po zakończeniu cyklu obróbki w procesorze tkankowym można przenieść koszyczki do stacji do zatapiania.

Zatapianie

Cel:

Odpowiednie ułożenie próbki w zestalonej parafinie na potrzeby mikrotomii.

Procedury:

1. Koszyczki z kasetami wyjmuje się z procesora i zanurza w wypełnionej parafiną przedniej komorze modułu podgrzewającego stacji do zatapiania albo kasety przenosi się do oddzielnego podgrzewacza parafiny.
2. Pierwszą kasetę przeznaczoną do zatopienia wyjmuje się z przedniej komory modułu podgrzewającego stacji do zatapiania lub podgrzewacza parafiny. Zdejmuje się i odrzuca pokrywę kasety, a oznaczenie na kasecie porównuje się z danymi dotyczącymi zwierzęcia w celu wyjaśnienia ewentualnych rozbieżności przed zatopieniem.
3. Wybiera się formę do zatapiania o odpowiednich rozmiarach.
4. Formę podstawia się pod dozownik modułu dozującego i wypełnia roztopioną parafiną.
5. Próbkę wyjmuje się z kasety i umieszcza w roztopionej parafinie w formie. W odniesieniu do każdej formy z parafiną czynność tę powtarza się dla 4–8 próbek. Rozmieszczenie poszczególnych ryb oznacza się poprzez umieszczenie ryby numer jeden pod kątem 180 stopni w stosunku do ryb 2–4/8.
6. Dodaje się dodatkową parafinę w celu zakrycia próbki.
7. Formę z podstawą kasety umieszcza się na płycie chłodzącej modułu chłodzącego.
8. Po zestaleniu parafiny blok (tj. zastygniętą parafinę zawierającą tkanki i podstawę kasety) wyjmuje się z formy.

Mikrotomia

Cel:

Cięcie i przygotowanie skrawków histologicznych do barwienia.

Procedury:

1. Wstępny etap mikrotomii określany jako »licowanie« przebiega następująco:
 - a. blok parafiny umieszcza się w uchwycie mikrotomu.
 - b. Obracając pokrętkę mikrotomu, przesuwa się uchwyt i odcina grube skrawki parafinowej powierzchni bloku aż do momentu, gdy nóż dotrze do zatopionych tkanek.

- c. mikrotom ustawia się tak, aby otrzymać skrawki o grubości 3–5 mikronów. Uchwyt przesuwany jest z bloku odcinany szeregiem skrawków w celu usunięcia wszelkich artefaktów powstałych na powierzchni cięcia tkanki podczas zgrubnego odcinania;
 - d. blok można wyjąć z uchwytu i umieścić na lodzie górną częścią w dół w celu nasączenia tkanki.
2. Następnym etapem mikrotomii jest końcowy podział i naciągnięcie skrawków tkanki na szkiełka. Procedury te przebiegają w następujący sposób:
- a. Jeżeli blok umieszczono na lodzie, zdejmujemy się go z lodu i ponownie umieszczamy w uchwycie mikrotomu.
 - b. w przypadku gdy ustawiona w mikrotomie grubość skrawka wynosi 3–5 mikronów, uchwyt przesuwany jest, obracając pokrętkę mikrotomu. Od bloku odcina się skrawki do momentu uzyskania »wstęgi« obejmującej co najmniej jeden odpowiedni skrawek zawierający gonady. (Jeżeli podczas odcinania skrawków zaistnieje taka konieczność, blok można wyjąć z uchwytu i umieścić na lodzie górną częścią w dół w celu nasączenia tkanki, a następnie ponownie umieścić w uchwycie).
 - c. Skrawki umieszcza się płasko na powierzchni wody w łaźni wodnej. Próbuje się uzyskać co najmniej jeden skrawek, pod którym nie ma żadnych nierówności ani pęcherzyków powietrza.
 - d. Szkiełko mikroskopowe zanurza się pod najlepszym skrawkiem i wyjmujemy skrawek z wody za pomocą szkiełka. Proces ten określa się jako naciągnięcie skrawka na szkiełko.
 - e. W przypadku zestawu ryb przygotowuje się trzy skrawki. Drugi i trzeci skrawek odcina się w odstępach 50 mikronów od pierwszego. Jeżeli ryby nie zostały osadzone w parafinie z gonadami na tym samym poziomie podziału, należy odcinać więcej skrawków, aby zapewnić uzyskanie z każdej ryby co najmniej sześciu skrawków zawierających gonady.
 - f. Za pomocą specjalnego pisaka na szkiełku zapisuje się numer bloku, z którego uzyskano szkiełko.
 - g. Szkiełko umieszcza się w stelażu do barwienia.
 - h. Blok wyjmujemy z uchwytu i umieszczamy górną częścią w dół w celu przechowania;

Barwienie, zamykanie szkiełkiem nakrywkowym i opisywanie szkiełek

Cele:

- Barwienie skrawków na potrzeby oceny histologicznej.
- Trwałe uszczelnienie naciągniętych i zabarwionych tkanek.
- Trwałe oznaczenie zabarwionych skrawków w sposób umożliwiający pełną identyfikowalność.

Procedury:

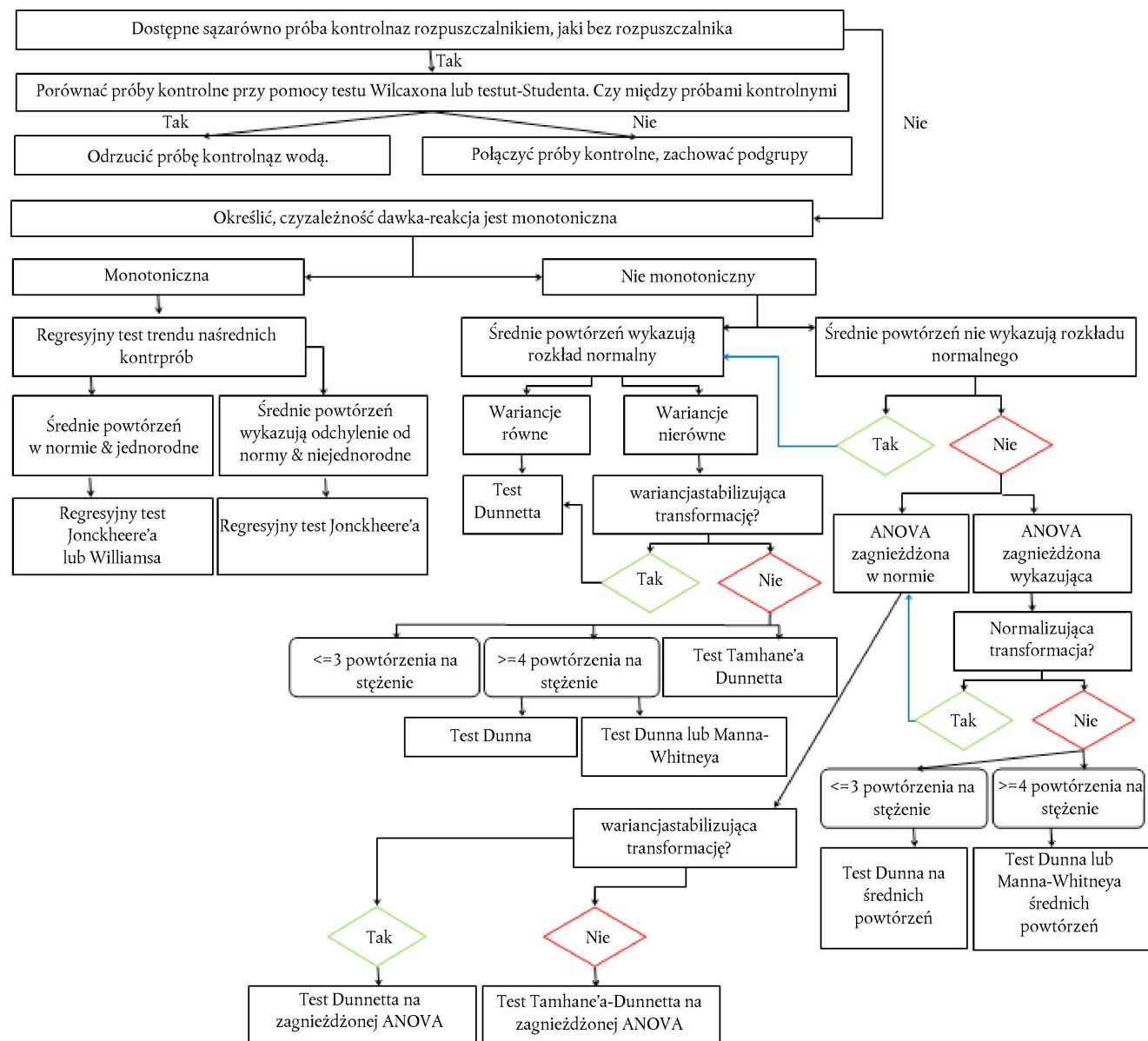
1. Barwienie
 - a. Szkiełka przed barwieniem przez całą noc suszy się powietrzem.
 - b. Do barwienia skrawków stosuje się hematoksylinę i eozynę.
2. Zamknięcie szkiełkiem nakrywkowym
 - a. Szkiełka nakrywkowe można nakładać ręcznie lub automatycznie.
 - b. Szkiełko zanurza się w ksylenu lub w preparacie TissueClear, a nadmiar ksylenu/TissueClear delikatnie usuwa się ze szkiełka.
 - c. W pobliżu końca szkiełka, położonego przeciwnie do zmatowionego końca, lub na szkiełko nakrywkowe nanosi się około 0,1 ml medium zamykającego.
 - d. Szkiełko nakrywkowe pochyla się pod niewielkim kątem w trakcie nakładania na szkiełko podstawowe.

3. Opisywanie

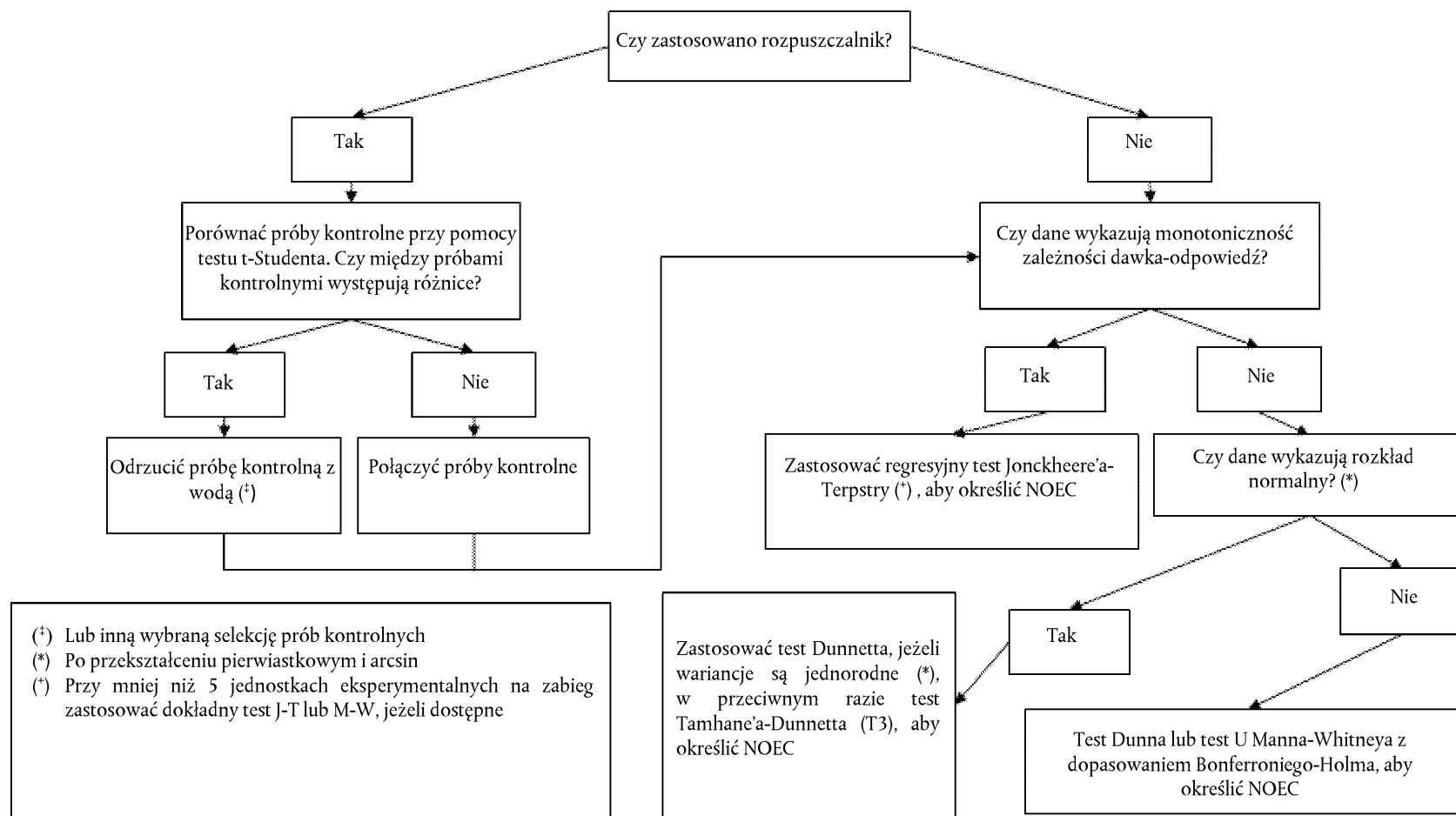
e. Etykieta na każdym szkiełku powinna zawierać następujące informacje.

- i. Nazwa laboratorium
 - ii. Gatunek
 - iii. Nr próbki / nr szkiełka
 - iv. Substancja chemiczna / grupa poddana zabiegowi
 - v. Data
- _____

Statystyczny schemat blokowy analizy poziomu witellogeniny



Statystyczny schemat blokowy analizy proporcji płci



Dodatek 9

Wytyczne dotyczące pobierania próbek tkanek w celu określenia płci genetycznej oraz w celu określenia płci genetycznej metodą PCR**Pobieranie, przygotowanie i przechowywanie próbek tkanek przed określeniem płci genetycznej metodą PCR w przypadku ryżanki (opracowanie: Laboratory for Aquatic Organisms of Bayer CropScience AG)**

1. Za pomocą małych nożyczek odcina się płetwę odbytową lub grzbietową każdej ryby i umieszcza w probówce wypełnionej 100 µl ekstrakcyjnego roztworu buforowego 1 (szczegółowe informacje dotyczące przygotowania roztworu buforowego podano poniżej). Nożyczki po każdej rybie myje się do czysta w zlewce wypełnionej destylowaną H₂O i osusza bibułą.
2. Następnie tkankę płetw poddaje się homogenizacji w probówce Eppendorfa za pomocą teflonowego tłuczka do lizy komórek. Do każdej próbki stosuje się nowy tłuzdek, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia. Tłuczki umieszcza się na noc w 0,5 M roztworze NaOH, płucze przez 5 minut w destylowanej H₂O i przechowuje w etanolu lub w stanie sterylnym po sterylizacji w autoklawie do czasu kolejnego użycia.
3. Możliwe jest również przechowywanie tkanki płetwy bez ekstrakcyjnego roztworu buforowego 1 na suchym lodzie, a następnie w chłodziarkach w temperaturze – 80 °C, aby zapobiec degeneracji DNA. Ekstrakcja przebiega jednak w skuteczniejszy sposób, jeżeli w tym samym czasie przeprowadza się ekstrakcję DNA (postępowanie zob. powyżej; po przechowywaniu w temperaturze – 80 °C próbki należy rozmrozić na lodzie, zanim wypełni się próbówki roztworem buforowym).
4. Po poddaniu homogenizacji wszystkie próbówki umieszcza się w łaźni wodnej i gotuje przez 15 minut w temperaturze 100 °C.
5. Następnie do każdej próbówki wkrapla się 100 µl roztworu buforowego 2 (szczegółowe informacje dotyczące przygotowania podano poniżej). Próbkę pozostawia się w temperaturze pokojowej na 15 minut, od czasu do czasu delikatnie wstrząsając ręcznie.
6. Następnie wszystkie próbówki ponownie umieszcza się w łaźni wodnej i gotuje przez kolejne 15 minut w temperaturze 100 °C.
7. Do czasu kolejnej analizy próbówki zamraża się w temperaturze – 20 °C.

Przygotowanie roztworu buforowego

Roztwór buforowy 1 stosowany w metodzie PCR:

500 mg N-Lauroylsarcosine (np. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

dodać 100 ml wody destylowanej

→ autoklaw

Roztwór buforowy 2 stosowany w metodzie PCR:

20 g Chelex (np. Biorad, Munich, GE)

doprowadzić do spęczenia w 100 ml wody destylowanej

→ autoklaw

Określanie płci genetycznej (metodą PCR) w przypadku ryżanki (przygotowane przez Laboratory for Aquatic Organisms of Bayer CropScience AG i Universität Würzburg Biozentrum)

Przygotowane i zamrożone próbówki (opisane w poprzedniej części) rozmraża się na lodzie. Następnie odwirowuje się je wykorzystując wirówkę Eppendorfa (30 sekund przy maksymalnej prędkości w temperaturze pokojowej). W przypadku metody PCR wykorzystuje się czysty supernatant oddzielony od osadu. Nie wolno pod żadnym pozorem dopuścić do przeniesienia jakichkolwiek śladowych ilości Chelexu (znajdującego się w osadzie) do reakcji PCR, ponieważ mogłoby to zakłócić działanie polimerazy Taq. Supernatant wykorzystuje się bezpośrednio lub przechowuje zamrożony (w temperaturze – 20 °C) i ponownie rozmraża do późniejszej analizy w kilku cyklach bez negatywnego wpływu na DNA.

1. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej (25 µl na próbkę):

	Objętość	Końcowe stężenie
Wzorzec DNA	0,5 µl–2 µl	
10x roztwór buforowy PCR z MgCl ₂	2,5 µl	1x
Nukleotydy (każdy z serii dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 µM)	200 µM
Primer lewy (10 µM) (zob. poniżej 3–5)	0,5µl	200 µM
Primer prawy (10 µM) (zob. poniżej 3–5)	0,5µl	200 µM
Sulfotlenek dimetylowy	1,25 µl	5 %
Woda (klasy PCR)	do 25 µl	
E-Polimeraza Taq	0,3 µl	1,5 U

10xroztwór buforowy z MgCl₂: 670 µM Tris/HCl (pH 8,8 w temperaturze 25 °C), 160 µM (NH₄)₂SO₄, 25 µM MgCl₂, 0,1-procentowy roztwór Tween 20

W odniesieniu do każdej PCR (zob. poniżej 3–5) niezbędny jest specjalny starter jako nowe połączenie mieszaniny reakcyjnej i odpowiednich niezbędnych ilości wzorca DNA dla każdej próbki (zob. powyżej). Odpowiednie ilości przenosi się do nowych probówek za pomocą pipet. Następnie wszystkie probówki zamyka się, a ich zawartość miesza (przez około 10 sekund) i odwirowuje (10 sekund w temperaturze pokojowej). Następnie można uruchomić odpowiednie programy PCR. Dodatkowo w każdym programie PCR stosuje się dodatnią próbę kontrolną (przykładowa próbka DNA o znanej aktywności i wyraźnych wynikach) oraz ujemną próbę kontrolną (1 µl wody destylowanej).

2. Przygotowanie żelu agarozowego (1 %) – podczas przeprowadzania programów PCR:

- rozpuścić 3 g agarozy w 300 ml 1 × roztworu buforowego TAE (1 % żel agarozowy)
- roztwór gotować w kuchence mikrofalowej (przez około 2–3 min.)
- przelać gorący roztwór do specjalnego pojemnika odlewniczego umieszczonego na lodzie
- po około 20 min. żel agarozowy jest gotowy do użycia.
- przechowywać żel agarozowy w 1 × roztworu buforowego TAE do końca programów PCR.

3. Program PCR z udziałem aktywny:

Ta reakcja PCR ma na celu wykazanie, że DNA w próbce nie jest uszkodzone.

- Specjalny starter:

»Mact1(górny/lewy)« TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

»Mact2(dolny/prawy)« GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

- Program:

5 min. w temperaturze 95 °C

Cykl (35-krotny):

Denaturacja → 45 sekund w temperaturze 95 °C

Hybrydyzacja → 45 sekund w temperaturze 56 °C

Wydłużenie → 1 min. w temperaturze 68 °C

15 min. w temperaturze 68 °C

4. Program PCR z udziałem genów X i Y:

W tej serii programu PCR zastosowane zostaną próbki z nieuszkodzonym DNA w celu wykrycia genów X i Y. Męskie DNA powinno zawierać jedną podwójną nić, a żeńskie DNA jedną pojedynczą (po barwieniu i elektroforezie w żelu). W tej serii programu należy uwzględnić jedną dodatnią próbę kontrolną dla samców (próbka XY) i jedną dla samic (próbka XX).

— Specjalny starter:

»PG 17.5« (górny/lewy) CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

»PG 17.6« (dolny/prawy) GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 min. w temperaturze 95 °C

Cykl (40-krotny):

Denaturacja → 45 sekund w temperaturze 95 °C

Hybrydyzacja → 45 sekund w temperaturze 55 °C

Wydłużenie → 1 min. 30 sekund w temperaturze 68 °C

15 min. w temperaturze 68 °C

5. Program PCR z udziałem genu Y jako próba kontrolna dla programu PCR z udziałem genów Y i X:

Ten program PCR pozwala zweryfikować wyniki »programu PCR z udziałem genu X i Y«. Próbki »męskie« powinny zawierać jedną nić, a próbki »żeńskie« żadnej (po barwieniu i elektroforezie w żelu).

— Specjalny starter:

»DMTYa (górny/lewy)« GGC CGG GTC CCC GGG TG

»DMTYd (dolny/prawy)« TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 min. w temperaturze 95 °C

Cykl (40-krotny):

Denaturacja → 45 sekund w temperaturze 95 °C

Hybrydyzacja → 45 sekund w temperaturze 56 °C

Wydłużenie → 1 min. w temperaturze 68 °C

15 min. w temperaturze 68 °C

6. Barwienie próbek PCR:

Roztwór barwiący:

50 % glicerolu

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % błękitu bromofenolowego

0,25 % ksilenocjanolu

Wprowadzić za pomocą pipety 1 µl roztworu barwiącego do każdej pojedynczej próbki.

7. Rozpocząć elektroforezę na żelu:

— sporządzony 1 % żel agarozowy przenosi się do komory elektroforezy na żelu wypełnionej 1 × buforem TAE;

— do szczeliny w żelu agarozowym wprowadza się za pomocą pipety 10–15 µl każdej z zabarwionych próbek PCR;

- do oddzielnej szczeliny wprowadza się za pomocą pipety również 5–15 µl zestawu 1kb-»Ladder« (firma Invitrogen);
- Rozpocząć elektroforezę doprowadzając napięcie 200 V.
- Zakończyć po 30–45 min.

8. *Oznaczenie nici*

- Wyczyścić żel agarozowy w wodzie destylowanej.
 - Następnie przenieść żel agarozowy na 15–30 min. do bromku etydyny.
 - Następnie należy wykonać zdjęcie żelu agarozowego w komorze z oświetleniem UV.
 - Ponadto próbki analizuje się, porównując je z nicią (lub nićmi) dodatniej próby kontrolnej i drabinką.
-

Dodatek 10

Wytyczne dotyczące pobierania próbek tkanek w celu określenia płci genetycznej metodą PCR w przypadku ciernika**Pobieranie próbek i ekstrakcja DNA**

Ekstrakcję DNA można przeprowadzić wykorzystując różnorodne dostępne na rynku odczynniki oraz systemy ekstrakcji ręcznej lub automatycznej. Poniżej opisano protokół stosowany w laboratorium Cefas Weymouth, a w stosowanych przypadkach dodano metody alternatywne.

1. Za pomocą małych nożyczek z części grzbietowo-bocznej (po usunięciu głowy i ogona do analizy VTG) każdej ryby pobiera się mały fragment tkanki (10–20 mg). Tkanekę umieszcza się w probówce i zanurza albo bezpośrednio w ciekłym azocie (do przechowywania w temperaturze – 80 °C), albo wypełnia roztworem 70 % etanolu (do transportu i późniejszego przechowywania w temperaturze 4 °C). Nożyczki myje się do czysta po każdej rybie w roztworze 70 % etanolu, a następnie w wodzie destylowanej i osusza bibułą.
2. Etanol (jeżeli jest obecny) usuwa się przez aspirację, a tkankę ekstrahuje się całą noc w obecności proteiny K w 400 µl roztworu buforowego ATL (Qiagen). Podwielokrotność (200 µl) roztworu przenosi się do 96-dółkowego bloku S (Qiagen) i ekstrahuje DNA w formacie 96-dółkowym z wykorzystaniem zestawu Qiagen Universal BioRobot i QIamp Investigator BioRobot. DNA wymywa się w 50 µl wody wolnej od deoksyrybonukleazy i rybonukleazy. W przypadku wykorzystania twardych tkanek (takich jak kręgosłup lub płetwa piersiowa) do ekstrakcji DNA konieczna może być homogenizacja próbki w roztworze buforowym do lizy za pomocą aparatu FastPrep® lub równoważnego systemu rozbijania tkanek.

Alternatywnie

- a) tkankę ekstrahuje się całą noc w obecności proteiny K w 400 µl roztworu buforowego do lizy G2 (Qiagen) i ekstrahuje się DNA z 200 µl ekstraktu za pomocą zestawu EZ-1 DNA easy tissue i biorobota EZ-1 lub zestawu DNA easy mini tissue. DNA wymywa się w 50 µl objętości;
 - b) tkanki przetwarza się przy zastosowaniu odczynnika DNAzol. Jednym słowem próbki tkanek poddaje się procesowi lizy w 1ml odczynnika DNAzol przez 10 minut w 1,5 ml mikroprowadce do wirówki, a następnie odwirowuje z prędkością 13 000 obr./min. przez 5 minut w celu oddzielenia cząstek stałych. Po procesie lizy próbkę przenosi się do nowej mikroprowadki o pojemności 1,5 ml, zawierającej 500 µl 100 % etanolu do biologii molekularnej, a następnie odwirowuje z prędkością 13 000 obr./min. przez 10 minut w celu strącenia DNA. Etanol usuwa się i zastępuje 400 µl roztworu 70 % etanolu do biologii molekularnej, odwirowuje z prędkością 13 000 obr./min. przez 5 minut, a osad DNA rozpuszcza się w 50 µl wody wolnej od cząsteczkowej deoksyrybonukleazy i rybonukleazy. Podobnie jak poprzednio w przypadku wykorzystania twardych tkanek (płetwa piersiowa) przed ekstrakcją DNA konieczna może być homogenizacja próbki w roztworze buforowym do lizy za pomocą aparatu FastPrep® lub równoważnego systemu rozbijania tkanek.
3. DNA przechowuje się w temperaturze – 20 °C do czasu aż będzie potrzebne.

Ważna uwaga: podczas tego procesu należy używać rękawiczek.

Analiza łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

Amplifikacje zostały wykonane przy użyciu 2,5 µl ekstraktu DNA w 50 µl objętości reakcyjnej z wykorzystaniem starterów Idh locus (jak opisał Peichel i in., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Starter lewy 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'

Starter prawy 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Istnieje szereg dostawców odpowiednich odczynników PCR. Opisana poniżej metoda jest obecnie stosowana w laboratorium Cefas Weymouth.

1. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej (50 µl na próbkę):

Mieszaninę główną sporządza się w opisany poniżej sposób. Można ją przygotować z wyprzedzeniem i przechowywać zamrożoną w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu wykorzystania. Sporządzić wystarczającą ilość mieszaniny głównej na potrzeby ujemnej próby kontrolnej (tylko woda do biologii molekularnej).

	Objętość (podstawowe stężenie)/ próbkę	Końcowe stężenie
5x roztwór buforowy do reakcji GoTaq®	10 µl	1x
MgCl ₂	5 µl (25 µM)	2,5 µM
Nukleotydy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 µM każda)	250 µM każda
Starter lewy	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Starter prawy	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Woda do biologii molekularnej	30,75 µl	
Polimeraza GoTaq	0,25 µl	1,25 U

- Umieścić 47,5 µl w oznakowanej, cienkościennej probówce do PCR o pojemności 0,5 ml.
- Dodać 2,5 µl oczyszczonego DNA do odpowiednio oznakowanej probówki. Powtarzać tę czynność w odniesieniu do wszystkich próbek i ujemnych prób kontrolnych.
- Wlać 2 krople oleju mineralnego. Ewentualnie użyć termocyklera z podgrzewaną pokrywą.
- Zamknąć pokrywki.
- Próbkę poddano denaturacji w termocyklerze Peltiera PTC-225 w temperaturze $94 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 5 minut, następnie 39 cyklom w temperaturze $94 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez minutę, w temperaturze $55 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 1 minutę, w temperaturze $72 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 1 minutę i na koniec w temperaturze $72 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 10 minut.

2. Przygotowanie żelu agarozowego (2 %):

Tradycyjnie produkty PCR rozpuszcza się na 20 % żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny.

Wykorzystać można również systemy elektroforezy kapilarnej.

- Zważyć 2 g agarozy w 100 ml 1 × roztworu buforowego TAE.
- Podgrzać w kuchence mikrofalowej (około 2–3 min.), aby rozpuścić agarozę.
- Dodać 2 krople bromku etydyny o stężeniu końcowym 0,5 µg/ml.
- Przenieść gorący roztwór do urządzenia do wylewania żelu.
- Pozostawić żel do zastygnięcia.

3. Elektroforeza żelowa:

- Przenieść żel agarozowy do urządzenia do elektroforezy i zatopić w 1 × roztworze buforowym TAE.
- Wprowadzić 20 µl każdej z próbek do oddzielnego dołka, dodając marker masy cząsteczkowej (100 bp DNA ladder, Promega) do zapasowego dołka.
- Elektroforezę przeprowadza się pod napięciem 120 V przez 30–45 minut.

4. Wizualizacja produktów amplifikacji

Jeżeli bromek etydyny został wprowadzony do żelu agarozowego, jak opisano powyżej, produkty DNA można zobrazować w źródle promieni UV. Można również zabarwić żel agarozowy pokrywając żel rozcieńczonym roztworem bromku etydyny (0,5 µg/ml w wodzie) na 30 minut przed wizualizacją.

Dodatek 11

Wytyczne dotyczące procedury sztucznego zapłodnienia w odniesieniu do ciernika

Celem niniejszej części jest opisanie procedur pozyskiwania zapłodnionych komórek jajowych od ciernika w celu wykorzystania ich do badania rozwoju płciowego ryb.

Procedury*Pozyskanie spermy od samców*

1. Dobrze wybarwiony samiec z żądanej populacji jest uśmiercany.
2. Z każdej strony ryby wycina się jądra. Jądra są z reguły mocno ubarwionymi, podłużnymi organami dobrze widocznymi na bocznej środkowej linii ciała. Zastosować jedną z poniższych metod:
3. Za pomocą małych nożyczek wykonać pojedyncze nacięcie o długości 1–1,5 cm, biegnące od odbytu pod kątem około 45 stopni.
4. Użyć skalpela w celu wykonania małego nacięcia z boku ryby nieco za miednicą od strony brzucha w stosunku do łusek na bokach.
5. Jądra usuwa się za pomocą małej pęsety i umieszcza na płytce Petriego.
6. Każde jądro pokrywa się 100 µl świeżo sporządzonego **końcowego roztworu Hanka (*)**.
7. Jądra kroi się w drobną kostkę za pomocą żyłki lub skalpela. Pozwala to uwolnić spermę, która nada roztworowi Hanka mleczny kolor.
8. Płyn zawierający spermę dodaje się do probówki, jednocześnie starając się nie dodać podczas wkraplania żadnego kawałka tkanki jąder.
9. Do probówki dodaje się 800 µl końcowego roztworu Hanka i dokładnie miesza.
10. W razie potrzeby samca można zakonserwować poprzez utrwalenie w roztworze 100 % etanolu lub innej pożądanej substancji utrwalającej. Jest to szczególnie ważne, jeżeli w badaniu potomstwo przypisuje się danym rodzicom.

(*) Buforowany roztwór soli Hanka (HBSS):

HBSS jest niezbędny do konserwacji spermy podczas przygotowywania do zapłodnienia.

Ważna uwaga: chociaż większość niezbędnych roztworów podstawowych można przygotować wcześniej, **roztwór podstawowy 5**, i w związku z tym **roztwór końcowy**, należy sporządzić świeżo w dniu, w którym mają zostać wykorzystane.

Roztwór podstawowy 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Woda destylowana	100 ml

Roztwór podstawowy 2

Na ₂ HPO ₄ (bezwodny)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
Woda destylowana	100 ml

Roztwór podstawowy 3

CaCl ₂	0,72 g
Woda destylowana	50 ml

Roztwór podstawowy 4

MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,23 g
Woda destylowana	50 ml

Roztwór podstawowy 5 (świeżo sporządzony)

NaHCO ₃	0,35 g
Woda destylowana	10 ml

Uwaga: jeżeli niektóre z powyższych soli są już w posiadaniu laboratorium, ale mają inną zawartość wody (tj. 2H₂O zamiast bezwodników), można ich nadal używać, ale najpierw należy skorygować masę na podstawie masy cząsteczkowej).

W celu uzyskania końcowego roztworu Hanka połączyć ze sobą w następującej kolejności:

roztwór podstawowy 1	1,0 ml
roztwór podstawowy 2	0,1 ml
roztwór podstawowy 3	0,1 ml
Woda destylowana	8,6 ml
roztwór podstawowy 4	0,1 ml
roztwór podstawowy 5	0,1 ml

Dokładnie wymieszać przed użyciem.

Zapłodnienie

1. Z żądanej populacji wybiera się duże, ciężarne samice; samice są gotowe do wyciśnięcia komórek jajowych tylko w przypadku, gdy komórki jajowe wystają w sposób widoczny z kloaki. Gotowe samice przyjmują charakterystyczną pozycję z głową w górę.
2. Delikatnie przesunąć palec lub kciuk po boku ryby w dół w kierunku ogona, aby spowodować wypuszczenie torebki z komórkami jajowymi na świeżą płytkę Petriego. Powtórzyć tę samą czynność po drugiej stronie i włożyć rybę z powrotem do jej zbiornika.
3. Komórki jajowe można rozprowadzić (tak aby utworzyły pojedynczą warstwę) za pomocą delikatnego pędzelka. Ważne jest, aby wystawić na działanie spermy jak najwięcej komórek jajowych, więc wskazane jest maksymalne zwiększenie powierzchni ikry. Ważna uwaga: ułożyć wokół komórek jajowych wilgotną tkaninę, aby cały czas były wilgotne (ważne jest, aby komórki jajowe nie stykały się bezpośrednio z wodą, ponieważ może to doprowadzić do przedwczesnego utwardzenia kosmówki, co uniemożliwi zapłodnienie). Poszczególne samice mogą produkować różną liczbę komórek jajowych, ale z pojedynczej ciężarnej samicy można z łatwością uzyskać przeciętnie około 150 komórek jajowych.
4. Po całej powierzchni komórek jajowych rozprowadza się równomiernie za pomocą pędzla 25 µl spermy umieszczonej w mieszaninie Hanka. Z chwilą rozpoczęcia procesu zapłodnienia komórki jajowe szybko twardnieją i zmieniają kolor (w ciągu minuty). Jeżeli szacowana liczba komórek jajowych wynosi więcej niż 150, powtórzyć procedurę. Również w przypadku gdy komórki jajowe nie stwardnieją w ciągu minuty, należy dodać jeszcze trochę spermy. Ważna uwaga: dodanie większej ilości spermy niekoniecznie poprawia wskaźnik zapłodnienia.
5. Komórki jajowe i roztwór spermy należy pozostawić w celu »interakcji« na co najmniej 15 minut, a zapłodnione komórki jajowe należy umieścić w akwariach do narażenia w ciągu 1,5 godziny od zapłodnienia.
6. Proces ten powtarza się z wykorzystaniem kolejnej samicy do momentu zebrania żądanej liczby komórek jajowych.
7. Zachować kilka komórek jajowych z ostatniej partii i utrwalić je w roztworze 10 % kwasu octowego.

Liczenie i rozdzielanie komórek jajowych na akwaria badawcze

1. Komórki jajowe należy równomiernie rozdzielać na każdym poziomie zabiegowym w celu uniknięcia genetycznego błędu systematycznego. Każdą partię zapłodnionych komórek jajowych należy podzielić na równe grupy (tyle, ile poziomów zabiegowych) za pomocą tępego narzędzia (szeroka pęseta entomologiczna lub pętla do inokulacji). Jeżeli zamierza się zastosować 4 kontrpróby na każdy zabieg, z 20 komórkami jajowymi w każdej kontrpróbie, wówczas należy rozdzielić 80 komórek jajowych na akwaria do badania narażenia. Ważna uwaga: zaleca się dodanie dodatkowych 20 % (tj. 96 komórek jajowych na każdy poziom zabiegowy), aż do momentu pewności uzyskania 100 % wskaźników zapłodnienia.
 2. Komórki jajowe ciernika są bardzo podatne na infekcje grzybicze poza obrębem gniazda chronionego przez ojca. Z tego względu kluczowe znaczenie ma poddanie wszystkich komórek jajowych działaniu błękitu metylenowego w ciągu pierwszych pięciu dni badania. Podstawowy roztwór błękitu metylenowego sporządza się w stężeniu 1 mg/ml i dodaje do akwariów badawczych, aby zapewnić maksymalne końcowe stężenie wynoszące 2,125 mg/l. Ważna uwaga: cierniki nie powinny być narażone na działanie błękitu metylenowego po wylęgu, więc 6. dnia system powinien być wolny od błękitu metylenowego.
 3. Komórki jajowe kontroluje się codziennie i odnotowuje się wszystkie martwe lub niezapłodnione komórki jajowe. Ważna uwaga: do momentu wyklucia komórki jajowe nie powinny w żadnym wypadku znaleźć się poza wodą nawet na bardzo krótkie okresy.
-

C.42 BIODGRADOWALNOŚĆ W WODZIE MORSKIEJ**OGÓLNE WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 306 (1992 r.) w sprawie badań. Gdy opracowywano oryginalne metody badawcze, nie było wiadomo, do jakiego stopnia można byłoby zastosować do środowiska morskiego wyniki badań przesiewowych dotyczących szybkiej biodegradowalności z wykorzystaniem wody słodkiej i ścieków oczyszczonych lub osadu czynnego jako inokulum. Zgłaszano zróżnicowane wyniki w tej kwestii (np. (1)).
2. Do morza dociera wiele rodzajów ścieków przemysłowych zawierających różne substancje chemiczne, w wyniku bezpośrednich zrzutów albo przez ujścia rzek i rzeki, w przypadku których czas zalegania jest krótki w porównaniu z okresem niezbędnym dla całkowitej biodegradacji wielu występujących w nich substancji chemicznych. Ze względu na rosnącą świadomość potrzeby ochrony środowiska morskiego przed wzrastającym obciążeniem substancjami chemicznymi oraz konieczność oszacowania prawdopodobnego stężenia substancji chemicznych w morzu opracowano metody badawcze dotyczące biodegradowalności w wodzie morskiej.
3. W przypadku metod opisanych w niniejszym dokumencie naturalną wodę morską wykorzystywano jako fazę wodną i jako źródło mikroorganizmów. Podczas prób mających na celu potwierdzenie możliwości zastosowania metod szybkiej biodegradowalności w wodzie słodkiej badano możliwość wykorzystania wody morskiej poddanej ultrafiltracji i odwirowaniu oraz osadów morskich jako inokulum. Badania te zakończyły się niepowodzeniem. W związku z tym środowiskiem badania jest naturalna woda morska poddana wstępnemu oczyszczaniu w celu usunięcia cząstek gruboziarnistych.
4. W celu oceny ostatecznej biodegradowalności przy użyciu metody wytrząsania w kolbie należy zastosować stosunkowo wysokie stężenia badanej substancji ze względu na niską czułość metody analitycznej z rozpuszczonym węglem organicznym. To z kolei wymaga dodania do wody morskiej mineralnych składników odżywczych (N i P), których niskie stężenia mogłyby w przeciwnym razie ograniczyć usuwanie rozpuszczonego węgla organicznego. Również w przypadku metody »zamkniętej butli« konieczne jest dodanie składników odżywczych ze względu na stężenie dodanej badanej substancji.
5. W związku z tym metody nie są badaniami szybkiej biodegradowalności, ponieważ nie dodaje się żadnego inokulum w celu uzupełnienia mikroorganizmów już obecnych już w wodzie morskiej. Badania nie symulują również warunków panujących w środowisku morskim, ponieważ dodaje się składniki odżywcze, a stężenie badanej substancji jest dużo wyższe niż byłoby w morzu. Z tych względów metody te przedstawiono w nowym punkcie »Biodegradowalność w wodzie morskiej«.

ZASTOSOWANIE

6. Wyniki badań, które zostałyby zastosowane, ponieważ wzorzec stosowania i usuwania substancji, o których mowa, wskazywał drogę do morza, dostarczają pierwszych informacji dotyczących biodegradowalności w wodzie morskiej. Jeżeli wynik jest pozytywny (> 70 % usuniętego rozpuszczonego węgla organicznego; > 60 % teoretycznego zapotrzebowanie na tlen (TZT)), można stwierdzić, że istnieje potencjał dla biodegradacji w środowisku morskim. Ujemny wynik nie wyklucza jednak istnienia takiego potencjału, ale wskazuje na konieczność przeprowadzenia dodatkowych badań, np. z zastosowaniem jak najniższego stężenia badanej substancji.
7. W obydwu przypadkach, jeżeli wymagana jest bardziej konkretna wartość w odniesieniu do tempa lub stopnia biodegradacji w wodach morskich w danym miejscu, należałoby zastosować bardziej złożone i wyrafinowane, a zatem bardziej kosztowne metody. Na przykład badanie symulacyjne przeprowadzić można z zastosowaniem stężenia badanej substancji bardziej zbliżonego do prawdopodobnego stężenia w środowisku. Wykorzystać można również niewzbogaconą, nieoczyszczoną wstępną wodę morską pobraną z lokalizacji będącej przedmiotem zainteresowania i po wstępnej biodegradacji przeprowadzić szczegółową analizę chemiczną. W przypadku ostatecznej biodegradowalności konieczne byłoby zastosowanie substancji oznakowanych ^{14}C , aby można było zmierzyć wskaźniki znikania rozpuszczalnego organicznego ^{14}C i wytwarzania $^{14}\text{CO}_2$ w warunkach rzeczywistych stężeń.

WYBÓR METOD

8. Wybór metody, którą należy zastosować, zależy od szeregu czynników; poniższa tabela ma służyć jako pomoc w wyborze metody. Chociaż substancji, których rozpuszczalność w wodzie jest niższa od wartości równoważnej około 5 mg C/l, nie można zbadać metodą wytrząsania w kolbie, słabo rozpuszczalne substancje można zasadniczo poddać przynajmniej badaniu metodą »zamkniętej butli«.

Tabela

Zalety i wady metody wytrząsania w kolbie i metody »zamkniętej butli«.

METODA	ZALETY	WADY
WYTRZĄSANIE W KOLBIE	— prosta aparatura, z wyjątkiem analizatora węgla — czas trwania 60 dni nie stanowi problemu — brak interferencji w związku z nitryfikacją — można ją dostosować do substancji lotnych	— wymagany jest analizator węgla — wykorzystanie 5–40 mg rozpuszczonego węgla organicznego/l, może wykazywać działanie hamujące — oznaczenie rozpuszczonego węgla organicznego jest trudne w przypadku jego niskich stężeń w wodzie morskiej (wpływ chlorku) — zawartość rozpuszczonego węgla organicznego jest czasami wysoka w wodzie morskiej
ZAMKNIĘTA BUTLA	— prosta aparatura — łatwe końcowe określenie — stosowane jest niskie stężenie badanej substancji (2 mg/l), w związku z tym mniejsze jest prawdopodobieństwo zahamowania — łatwo można ją dostosować do substancji lotnych	— możliwe trudności z utrzymaniem szczelności butelek — rozwój bakterii na ściankach może prowadzić do fałszywych wartości — wartości absorpcji O₂ w ślepych próbach mogą być wysokie, szczególnie po 28 dniach; można sobie z tym poradzić dzięki starzeniu wody morskiej — możliwa interferencja w związku z pobieraniem O₂ w procesie nitryfikacji

METODA WYTRZĄSANIA W KOLBIE**WPROWADZENIE**

1. Metoda ta stanowi wariant zmodyfikowanego badania przesiewowego OECD dla wody morskiej, opisanego w rozdziale C.4B niniejszego załącznika (2). Prace nad metodą zostały ukończone w wyniku badania międzylaboratoryjnego zorganizowanego dla Komisji Europejskiej przez Danish Water Quality Institute (3).
2. Podobnie jak w przypadku badania wody morskiej metodą »zamkniętej butli«, wyniki tego badania nie mają zostać przyjęte jako wskaźniki szybkiej biodegradowalności, ale mają być konkretnie wykorzystywane do uzyskania informacji na temat biodegradowalności substancji w środowiskach morskich.

ZASADA METODY

3. Określoną uprzednio ilość badanej substancji rozpuszcza się w środowisku badania, tak aby uzyskać stężenie 5–40 mg rozpuszczonego węgla organicznego (DOC)/l. Jeżeli granice wrażliwości analiz węgla organicznego uległy poprawie, korzystne może być wykorzystanie niższych stężeń badanych substancji, w szczególności substancji hamujących. Roztwór badanej substancji w środowisku badania jest inkubowany w warunkach mieszania, bez dostępu światła lub w rozproszonym świetle w warunkach aerobowych w stałej temperaturze (regulowanej z dokładnością do ± 2 °C), która zazwyczaj mieści się w przedziale 15–20 °C. W przypadku gdy celem badania jest symulowanie sytuacji środowiskowych, można prowadzić badania poza powyższym normalnym zakresem temperatury. Zalecany maksymalny czas trwania badania wynosi około 60 dni. Po degradacji mierzy się zawartość rozpuszczonego węgla organicznego (degradacja ostateczna), a w niektórych przypadkach dokonuje szczegółowej analizy (degradacja pierwotna).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI

4. Aby stwierdzić, czy badanie może zostać zastosowane w odniesieniu do konkretnej substancji, muszą być znane jej niektóre właściwości. Należy ustalić poziom zawartości węgla organicznego w substancji, lotność substancji musi uniemożliwiać znaczące straty substancji w trakcie badania, a jej rozpuszczalność w wodzie powinna być większa niż ekwiwalent 25–40 mg C/l. Ponadto badana substancja nie powinna ulegać znaczącej adsorpcji na powierzchniach szklanych. Wymagane są informacje na temat czystości lub względnych proporcji głównych składników badanej substancji, aby można było zinterpretować uzyskane wyniki, zwłaszcza gdy wynik jest zbliżony do poziomu akceptacji.

5. Informacje na temat toksyczności badanej substancji w stosunku do bakterii, mierzonych na przykład w krótkoterminowych badaniach szybkości oddychania (4), mogą być pomocne w wyborze odpowiednich badanych stężeń i mogą mieć zasadnicze znaczenie dla prawidłowej interpretacji niskich wartości biodegradacji. Informacje takie nie zawsze jednak wystarczą, aby dokonać interpretacji wyników uzyskanych w badaniu biodegradacji, więc procedura opisana w pkt 18 jest bardziej odpowiednia.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

6. W celu sprawdzenia aktywności mikroorganizmów w próbce wody morskiej należy zastosować właściwe substancje odniesienia. Przykładami substancji, których można użyć do tego celu, są benzoesan sodu, octan sodu i anilina. Substancje odniesienia muszą ulec rozkładowi w odpowiednio krótkim czasie, w przeciwnym razie zaleca się powtórzenie badania z wykorzystaniem innej próbki wody morskiej.
7. W badaniu międzylaboratoryjnym KE, w którym próbki wody morskiej pobierano z różnych lokalizacji i o różnych porach roku (3), faza zwłoki (t_L) i czas potrzebny do 50 % degradacji (t_{50}), z wyłączeniem fazy zwłoki, w przypadku benzoesanu sodu wynosiły odpowiednio 1–4 dni i 1–7 dni. W przypadku aniliny, t_L wynosił 0–10 dni, zaś t_{50} wynosił 1–10 dni.

ODTWARZALNOŚĆ I CZUŁOŚĆ METODY

8. Odtwarzalność metody ustalono w badaniu międzylaboratoryjnym (3). Najniższe stężenie badanej substancji, w przypadku którego można zastosować tę metodę z analizą rozpuszczonego węgla organicznego, jest w dużej mierze wyznaczone granicą wykrywalności analizy węgla organicznego (obecnie około 0,5 mg C/l) i stężeniem węgla organicznego rozpuszczonego w wodzie morskiej (zwykle rzędu 3–5 mg/l w przypadku wody z otwartego morza). Po dodaniu badanej substancji stężenie tła rozpuszczonego węgla organicznego nie powinno przekroczyć około 20 % całkowitego stężenia rozpuszczonego węgla organicznego. Jeżeli nie jest to wykonalne, stężenie tła rozpuszczonego węgla organicznego można czasem zredukować, postarzając wodę morską przed badaniem. Jeżeli metodę tę stosuje się tylko ze szczegółową analizą chemiczną (umożliwiającą pomiar pierwotnej degradacji), badacz musi udokumentować, czy można oczekiwać ostatecznej degradowalności, dostarczając dodatkowych informacji. Te dodatkowe informacje mogą obejmować wyniki innych badań dotyczących szybkiej lub naturalnej biodegradowalności.

OPIS METODY

Aparatura

9. Zwykła aparatura laboratoryjna oraz:
- wytrząsarka, w której mieszczą się kolby Erlenmeyera o pojemności 0,5–2 litrów, z automatyczną kontrolą temperatury lub stosowana w stałej temperaturze pokojowej 15–20 °C regulowanej z dokładnością ± 2 °C;
 - kolby Erlenmeyera z wąską szyjką o pojemności 0,5–2 litra;
 - aparat do filtracji membranowej lub wirówka;
 - filtry membranowe, 0,2–0,45 μm ;
 - analizator węgla;
 - urządzenia do szczegółowej analizy (nieobowiązkowe).

Woda morska

10. Próbkę wody morskiej należy pobrać do dokładnie oczyszczonego pojemnika i przetransportować do laboratorium, najlepiej w ciągu jednego lub dwóch dni od pobrania próbki. Podczas transportu nie wolno dopuścić, aby temperatura próbki znacząco przekroczyła temperaturę, w której będzie prowadzone badanie. Należy dokładnie zidentyfikować miejsce próbkowania i opisać je pod względem poziomu zanieczyszczenia i składników odżywczych. W szczególności w przypadku wód przybrzeżnych lub zanieczyszczonych należy uwzględnić w tej charakterystyce liczbę kolonii drobnoustrojów cudzożywnych i określenie stężeń rozpuszczonych azotanów, związków amonu i fosforanów.

11. W odniesieniu do samej próbki wody morskiej należy podać następujące informacje:
- data pobrania;
 - głębokość pobrania;
 - wygląd próbki – mętna itd.;
 - temperatura w czasie pobrania;
 - zasolenie;
 - rozpuszczony węgiel organiczny;
 - upływ czasu między pobraniem a wykorzystaniem w badaniu.
12. Jeżeli stwierdzone zostanie, że zawartość rozpuszczonego węgla organicznego w wodzie morskiej jest wysoka (pkt 8), zaleca się starzenie wody morskiej co najmniej przez tydzień przed jej wykorzystaniem w badaniu. Woda powinna być przechowywana w warunkach tlenowych w temperaturze badania i bez dostępu światła lub w rozproszonym świetle. W razie potrzeby należy utrzymać warunki tlenowe zapewniając delikatne napowietrzanie. Podczas starzenia wody zmniejsza się zawartość łatwo rozkładających się substancji organicznych. W badaniu międzylaboratoryjnym (3) nie wykazano żadnej różnicy między potencjałem degradacji postarzonych próbek wody morskiej i świeżo pobranych próbek. Przed użyciem wodę morską należy wstępnie oczyścić, usuwając duże cząstki, np. filtrując na filtrze nylonowym albo zgrubnym filtrze papierowym (nie stosować filtrów membranowych ani filtrów GF/C) lub w drodze sedymentacji i dekantacji. W sprawozdaniu należy podać zastosowaną procedurę. Wstępne oczyszczanie należy przeprowadzić po starzeniu wody, jeżeli poddano ją temu procesowi.

Roztwory podstawowe dla mineralnych składników odżywczych

13. Należy przygotować następujące roztwory podstawowe, stosując odczynniki do analiz:

a)	Diwodoroortofosforan potasu, KH_2PO_4	8,50 g
	Monowodoroortofosforan dipotasu, K_2HPO_4	21,75 g
	Dwuwodny wodoroortofosforan disodu, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
	Chlorek amonu, NH_4Cl	0,50 g
	Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.	
b)	Chlorek wapnia, CaCl_2	27,50 g
	Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.	
c)	Siedmiowodny siarczan magnezu, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
	Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.	
d)	Sześciowodny chlorek żelaza(III), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.	

Można uniknąć strącania w roztworze (d), dodając jedną kroplę stężonego HCl albo 0,4 g kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA, sól dwusodowa) na litr. Jeżeli w roztworze podstawowym powstanie zawiesina, należy zastąpić go świeżo przygotowanym roztworem.

Przygotowanie środowiska badania

14. Należy dodać 1 ml każdego z powyższych roztworów podstawowych na każdy litr wstępnie oczyszczonej wody morskiej.

Inokulum

15. Nie dodawać konkretnego inokulum w celu uzupełnienia mikroorganizmów już obecnych w wodzie morskiej. Określić (nieobowiązkowo) liczbę organizmów cudzożywnych tworzących kolonie w wodzie morskiej stanowiącej środowisko badania (i najlepiej również w pierwotnych próbkach wody morskiej), np. na podstawie liczby kolonii na agarze morskim. Jest to szczególnie pożądane w przypadku próbek z terenów przybrzeżnych lub zanieczyszczonych. Sprawdzić aktywność mikroorganizmów cudzożywnych w wodzie morskiej, przeprowadzając badanie z substancją odniesienia.

Przygotowanie kolb

16. Upewnić się, czy wszystkie szklane naczynia zostały dokładnie wyczyszczone, chociaż niekoniecznie muszą być one sterylne (np. mieszaniną alkoholu i kwasu chlorowodorowego), opłukane i osuszone przed użyciem, aby uniknąć zanieczyszczenia pozostałościami z poprzednich badań. Kolby należy również oczyścić przed pierwszym użyciem.
17. Badane substancje należy ocenić, używając dwóch kolb równocześnie wraz z pojedynczą kolbą na substancję odniesienia. Wykonać podwójną ślepą próbę, nie zawierającą badanej substancji ani substancji odniesienia, w celu oznaczenia ślepych prób do analizy. Rozpuścić badane substancje w środowisku badania – praktycznie jest dodawać je stosując stężony roztwór podstawowy, aby zapewnić pożądane stężenia początkowe wynoszące normalnie 5–40 mg DOC/l. Zwykle należy badać substancję odniesienia przy początkowym stężeniu odpowiadającym 20 mg DOC/l. W przypadku stosowania roztworów podstawowych badanej substancji lub substancji odniesienia należy upewnić się, czy zasolenie użytej do badania wody morskiej nie uległo znacznej zmianie.
18. Jeżeli można spodziewać się skutków toksycznych lub nie można ich wykluczyć, zalecane byłoby włączenie do projektu badania dwukrotnego eksperymentu z zahamowaniem. Dodać badaną substancję i substancję odniesienia do tego samego naczynia, przy czym, aby umożliwić porównanie, stężenie substancji odniesienia normalnie powinno być takie samo jak w próbie kontrolnej (tj. 20 mg DOC/l).
19. Wprowadzić właściwe ilości roztworów do badań do kolbach Erlenmeyera (dogodna ilość wynosi do około połowy objętości kolby), a następnie każdą kolbę przykryć luźną pokrywą (np. folią aluminiową), która umożliwia wymianę gazów między kolbą a otaczającym ją powietrzem. (Tampony z waty nie są odpowiednie w przypadku stosowania analizy rozpuszczonego węgla organicznego). Naczynia należy umieścić w wytrząsarce i wytrząsać w sposób ciągły w wolnym tempie (np. 100 obrotów na minutę) przez cały czas trwania badania. Kontrolować temperaturę (15–20 °C z dokładnością ± 2 °C) oraz chronić naczynie przed światłem, aby uniknąć wzrostu glonów. Upewnić się, czy powietrze jest wolne od toksycznych substancji.

Fizykochemiczna próba kontrolna (nieobowiązkowa)

20. W przypadku gdy zachodzi podejrzenie degradacji abiotycznej lub występowania mechanizmów prowadzących do strat, takich jak hydroliza (problem dotyczy tylko szczegółowej analizy), parowanie lub adsorpcja, zaleca się wykonanie fizykochemicznej próby kontrolnej. Można ją wykonać dodając chlorek rtęci (II) (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50–100 mg/l) do naczyń zawierających badaną substancję w celu zatrzymania aktywności mikrobiologicznej. Znaczące obniżenie rozpuszczonego węgla organicznego lub specyficznego stężenia substancji w fizykochemicznym badaniu próby kontrolnej wskazuje na występowanie abiotycznych mechanizmów usuwania. (W przypadku zastosowania chlorku rtęci należy zwrócić uwagę na zakłócenia lub zatrucie katalizatorem w analizie rozpuszczonego węgla organicznego.)

Liczba kolb

21. W typowej analizie stosuje się następujące kolby:

Kolby 1 i 2 zawierające badaną substancję (badana zawiesina);

Kolby 3 i 4 zawierające wyłącznie wodę morską (ślepa próba);

Kolba 5 zawierająca substancję odniesienia (próba kontrolna procedury);

Kolba 6 zawierająca badaną substancję i substancję odniesienia (próba kontrolna toksyczności) – nieobowiązkowa;

Kolba 7 zawierająca badaną substancję i środek sterylizujący (abiotyczna sterylna próba kontrolna) – nieobowiązkowa.

Analiza rozpuszczonego węgla organicznego

22. W trakcie badania należy pobierać próbki do analizy rozpuszczonego węgla organicznego w odpowiednich odstępach czasu (zob. dodatek 1). Próbkę należy pobierać zawsze na początku badania (dzień 0) i w 60. dniu badania. Aby opisać przebieg degradacji w czasie, należy pobrać łącznie co najmniej pięć próbek. Nie można określić żadnego ustalonego harmonogramu pobierania próbek, ponieważ tempo biodegradacji jest różne. Należy dwukrotnie wykonać oznaczenie rozpuszczonego węgla organicznego dla każdej próbki.

⁽¹⁾ Chlorek rtęci (II) (HgCl_2) jest bardzo toksyczną substancją, wymagającą zachowania odpowiednich środków ostrożności. Uwodnione odpady, zawierające tę substancję chemiczną, należy usuwać we właściwy sposób; nie wolno odprowadzać ich do kanalizacji ściekowej.

Pobieranie próbek

23. Wymagana objętość próbek zależy od metody analitycznej (analiza szczegółowa), zastosowanego analizatora węgla i od procedury (filtracja membranowa lub odwirowanie) wybranej w celu obróbki próbek przed oznaczeniem węgla (pkt 25 i 26). Przed pobraniem próbek należy upewnić się, czy środowisko badania jest dobrze wymieszane i czy wszelkie substancje przylegające do ściany kolby zostały rozpuszczone lub znalazły się w zawiesinie.
24. Natychmiast po pobraniu próbek należy je przefiltrować na filtrze membranowym lub odwirować. W razie potrzeby należy przechowywać odfiltrowane lub odwirowane próbki w temperaturze 2–4 °C przez okres do 48 godzin lub w temp. – 18 °C przez dłuższe okresy (jeżeli wiadomo, że w substancji nie nastąpią zmiany, należy zakwaszyć do pH 2 przed przechowywaniem).
25. Filtry membranowe (0,2–0,45 µm) są odpowiednie, w przypadku gdy upewniono się, że nie przepuszczają węgla ani nie adsorbują substancji podczas filtracji, np. membranowe filtry poliwęglanowe. Niektóre filtry membranowe są impregnowane środkami powierzchniowo czynnymi w celu hydrofilizacji i mogą uwalniać znaczne ilości rozpuszczonego węgla. Filtry takie należy przygotować, wygotowując je trzykrotnie w wodzie dejonizowanej, za każdym razem przez godzinę. Po wygotowaniu filtry należy przechowywać w wodzie dejonizowanej. Odrzucić pierwsze 20 ml filtratu.
26. Odwirowanie próbek można wybrać jako alternatywę dla filtracji membranowej. Odwirowywać przy 40 000 m/s² (~ 4 000 g) przez 15 minut, najlepiej w schłodzonej wirówce.

Uwaga: zróżnicowanie zawartości całkowitego węgla organicznego (TOC) względem rozpuszczonego węgla organicznego (TOC/DOC) przez odwirowanie przy bardzo niskich stężeniach wydaje się nieskuteczne, ponieważ nie zostają usunięte wszystkie bakterie albo węgiel jako składnik plazmy bakteryjnej ponownie się rozpuszcza. Wydaje się, że przy wyższych badanych stężeniach (> 10 mg C na litr) błąd związany z odwirowywaniem jest stosunkowo mały.

Częstotliwość pobierania próbek

27. Jeżeli analizy przeprowadza się natychmiast po pobraniu próbek, czas następnego pobrania próbek należy oszacować na podstawie wyniku oznaczenia analitycznego.
28. Jeżeli próbki zachowuje się (pkt 24) do późniejszej analizy, należy pobrać więcej próbek niż minimalne pięć. Najpierw poddać analizie ostatnie próbki; stopniowa selekcja »wsteczna« właściwych próbek do analizy umożliwia uzyskanie dobrego opisu krzywej biodegradacji przy stosunkowo niewielkiej liczbie oznaczeń analitycznych. Jeżeli do zakończenia badania nie nastąpi żadna degradacja, nie ma potrzeby analizowania dalszych próbek; w tej sytuacji strategia »wsteczna« może przyczynić się do zaoszczędzenia znacznych kosztów związanych z analizami.
29. Jeżeli krzywa degradacji osiąga stan równowagi przed 60 dniem, należy zakończyć badanie. Jeżeli degradacja w oczywisty sposób rozpoczęła się przed 60. dniem, ale nie osiągnęła stanu równowagi, należy przedłużyć eksperyment na kolejny okres.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**Opracowanie wyników**

30. Wyniki analiz należy wpisać do załączonej karty charakterystyki (dodatek 2) i obliczyć wartości biodegradacji zarówno substancji badanej, jak i substancji odniesienia za pomocą równania:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

gdzie:

D_t = degradacja w procentach rozpuszczonego węgla organicznego lub usunięcia konkretnej substancji w czasie t ,

C_0 = stężenie początkowe rozpuszczonego węgla organicznego lub konkretnej substancji w środowisku badania,

C_t = stężenie rozpuszczonego węgla organicznego lub konkretnej substancji w środowisku badania w czasie t ,

$C_{bl(0)}$ = stężenie początkowe rozpuszczonego węgla organicznego lub konkretnej substancji w ślepej próbce,

$C_{bl(t)}$ = stężenie rozpuszczonego węgla organicznego lub konkretnej substancji w ślepej próbce w czasie t .

31. Degradację podać jako wartość procentową usunięcia rozpuszczonego węgla organicznego (degradacja ostateczna) lub usunięcie konkretnej substancji (degradacja pierwotna) w czasie t . Stężenia rozpuszczonego węgla organicznego obliczać z dokładnością do 0,1 mg na litr, a średnie wartości D_t należy zaokrąglić z dokładnością do pełnego procenta.
32. Przebieg degradacji należy zilustrować graficznie na diagramie, jak pokazano na rys. »Ważność i interpretacja wyników«. Jeżeli dostępne są wystarczające dane, z krzywej należy wyznaczyć fazę zwłoki (t_L) i czas od zakończenia fazy zwłoki potrzebny do osiągnięcia 50 % usunięcia (t_{50}).

Sprawozdanie z badania

33. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- cechy fizyczne, oraz, w stosownych przypadkach, właściwości fizykochemiczne;
- dane dotyczące tożsamości.

Warunki badania:

- lokalizacja i opis pobrania próbki; ocena poziomu zanieczyszczenia i składników odżywczych (liczba drobnoustrojów, azotany, związki amonu, fosforany, w stosownych przypadkach);
- charakterystyka próbki (data pobrania próbki, głębokość, wygląd, temperatura, zasolenie, rozpuszczony węgiel organiczny (nieobowiązkowe), upływ czasu od pobrania do użycia w badaniu);
- metoda (jeśli została zastosowana) do starzenia wody morskiej;
- metoda wstępnego oczyszczania (filtracja/sedymentacja) wody morskiej;
- metoda zastosowana do oznaczenia rozpuszczonego węgla organicznego;
- metoda zastosowana do szczegółowej analizy (nieobowiązkowa);
- metoda zastosowana do oznaczania liczby organizmów cudzożywnych w wodzie morskiej (liczba kolonii lub inna procedura) (nieobowiązkowa);
- inne metody (nieobowiązkowe) zastosowane w celu scharakteryzowania wody morskiej (pomiar ATP itd.).

Wyniki:

- dane analityczne zamieszczone w karcie charakterystyki (dodatek 2);
- przebieg badania degradacji przedstawia się graficznie na wykresie pokazującym fazę zwłoki (t_L), kąt nachylenia krzywej i czas (od zakończenia fazy zwłoki) potrzebny do osiągnięcia 50 % usunięcia (t_{50}). Fazę zwłoki można oszacować graficznie, jak pokazano na rysunku w sekcji »Ważność i interpretacja wyników«, lub dogodnie przyjąć jako czas potrzebny do osiągnięcia degradacji na poziomie 10 %;
- procentowa degradacja zmierzona po 60 dniach albo na koniec badania.

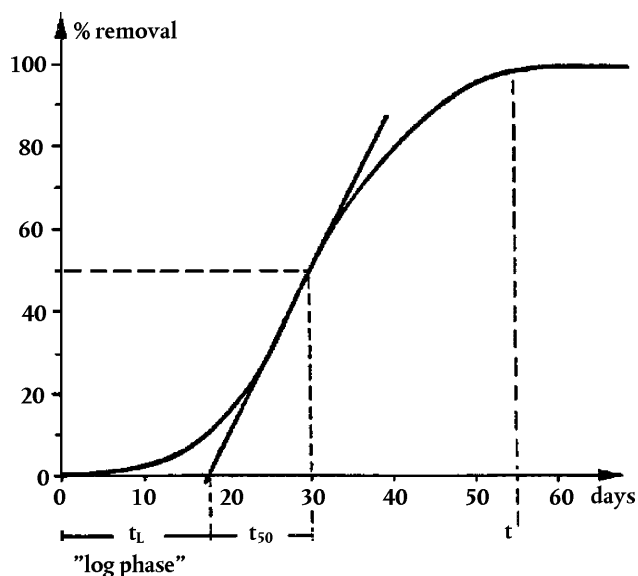
Omówienie wyników.

Ważność i interpretacja wyników

34. Wyniki otrzymane z zastosowaniem substancji odniesienia, np. benzoesu sodu, octanu sodu i aniliny, powinny być porównywalne z wynikami otrzymanymi w badaniu międzylaboratoryjnym (3) (należy odnieść się do sekcji »Substancje odniesienia«, pkt 7). Jeżeli wyniki otrzymane z zastosowaniem substancji odniesienia są nietypowe, badanie należy powtórzyć, wykorzystując inną próbkę wody morskiej. Choć wyniki badań zahamowania nie zawsze mogą być proste w interpretacji, ponieważ badana substancja stanowi dodatkowe źródło rozpuszczonego węgla organicznego, znaczący spadek tempa usuwania całkowitego rozpuszczonego węgla organicznego, w porównaniu z próbą kontrolną, stanowi dodatnią oznakę skutków toksycznych.

35. W związku z tym, że zastosowane badane stężenia są stosunkowo wysokie w porównaniu z większością naturalnych systemów (i w konsekwencji z niekorzystnym stosunkiem między stężeniem badanych substancji i innych źródeł węgla), metodę tę należy uważać za badanie wstępne, które można wykorzystać do wskazania, czy dana substancja łatwo ulega biodegradacji. Zatem niski wynik niekoniecznie oznacza, że badana substancja nie ulega biodegradacji w środowiskach morskich, lecz wskazuje, że potrzebny będzie większy wkład pracy, aby to ustalić.

Na poniższym rysunku pokazano przykład teoretycznego badania degradacji ilustrujący wykonalny sposób oszacowania wartości t_L (długość »fazy zwłoki«) i t_{50} (przedział czasowy, zaczynający się w momencie t_L , potrzebny do osiągnięcia usunięcia na poziomie 50 %).



METODA »ZAMKNIĘTEJ BUTLI«

WPROWADZENIE

1. Metoda ta stanowi wariant badania »zamkniętej butli« (5) i została ostatecznie opracowana w wyniku badania międzylaboratoryjnego zorganizowanego dla Komisji Europejskiej przez Danish Water Quality Institute (3).
2. Podobnie jak w przypadku towarzyszącej metody wytrząsania w kolbie z wodą morską, wyniki tego badania nie mają zostać przyjęte jako wskaźniki szybkiej biodegradowalności, ale mają być konkretnie wykorzystywane do uzyskania informacji na temat biodegradowalności substancji w środowiskach morskich.

ZASADA METODY

3. Uprzednio określoną ilość badanej substancji rozpuszcza się w środowisku badania w stężeniu wynoszącym zwykle 2–10 mg badanej substancji na litr (można zastosować jedno stężenie lub więcej). Roztwór przechowuje się w napełnionej zamkniętej butli bez dostępu światła w łaźni stałotemperaturowej lub w obudowie o temperaturze kontrolowanej z dokładnością do ± 1 °C w zakresie 15–20 °C. W przypadkach, w których celem badania jest symulowanie sytuacji środowiskowych, można prowadzić badania poza normalnym zakresem temperatury, pod warunkiem że odpowiednio skoryguje się kontrolę temperatury. Po degradacji następuje 28 dniowy okres analiz tlenu.
4. Badanie międzylaboratoryjne wykazało, że w przypadku gdy badanie przedłużano powyżej 28 dni, nie można było uzyskać żadnych użytecznych informacji, w większości przypadków ze względu na poważne zakłócenia. Wartości biochemicznego zapotrzebowania na tlen (BZT) w ślepej próbie były nadmiernie wysokie, prawdopodobnie ze względu na porosty występujące na ściankach na skutek braku potrząsania, a także w wyniku nityfikacji. W związku z tym zalecany czas wynosi 28 dni, jeżeli jednak wartość BZT w ślepej próbie pozostaje w granicach 30 % (pkt 15 i 40), badanie można przedłużyć.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI

5. Aby stwierdzić, czy badanie może zostać zastosowane w odniesieniu do konkretnej substancji, muszą być znane jej niektóre właściwości. Aby obliczyć teoretyczne zapotrzebowanie na tlen (TZT), wymagany jest wzór empiryczny (zob. dodatek 3); w przeciwnym razie należy oznaczyć chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT) danej substancji, aby służyło jako wartość odniesienia. Wykorzystanie ChZT jest mniej zadowalające, ponieważ niektóre substancje nie utleniają się całkowicie w badaniu ChZT.
6. Rozpuszczalność substancji powinna wynosić co najmniej 2 mg/l, choć w zasadzie można badać substancje, które są rozpuszczalne w mniejszym stopniu, takie jak substancje lotne (np. stosując działanie ultradźwiękami). Wymagane są informacje na temat czystości lub względnych proporcji głównych składników badanej substancji, aby można było zinterpretować uzyskane wyniki, zwłaszcza gdy wynik jest zbliżony do poziomu akceptacji.
7. Informacje na temat toksyczności badanej substancji w stosunku do bakterii, np. mierzone w krótkich badaniach oddychania (4), mogą być bardzo użyteczne przy wyborze odpowiednich badanych stężeń i mogą mieć istotne znaczenie dla prawidłowej interpretacji niskich wartości biodegradacji. Informacje takie nie zawsze jednak wystarczą, aby dokonać interpretacji wyników uzyskanych w badaniu biodegradacji, więc procedura opisana w pkt 27 jest bardziej odpowiednia.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

8. W celu sprawdzenia aktywności mikroorganizmów w próbce wody morskiej należy zastosować właściwe substancje odniesienia. Anilina, octan sodu i benzoetan sodu to przykłady substancji, które można zastosować w tym celu. Degradacja tych substancji na poziomie co najmniej 60 % (ich TZT) musi zajść w odpowiednio krótkim czasie, w przeciwnym razie zaleca się powtórzenie badania z wykorzystaniem innej próbki wody morskiej.
9. W badaniu międzylaboratoryjnym KE, w którym próbki wody morskiej pobierano w różnych lokalizacjach i o różnych porach roku, faza zwłoki (t_L) i czas potrzebny do osiągnięcia degradacji na poziomie 50 % (t_{50}), z wyłączeniem fazy zwłoki, w przypadku benzoetanu sodu wynosiły odpowiednio 0–2 dni i 1–4 dni. W przypadku aniliny wartości t_L i t_{50} wynosiły odpowiednio 0–7 i 2–12 dni.

ODTWARZALNOŚĆ

10. Odtwarzalność tych metod ustalono w badaniu międzylaboratoryjnym KE (3).

OPIS METODY

Aparatura

11. Zwykły sprzęt laboratoryjny oraz:
 - a) można wykorzystać butle do BZT o pojemności 250–300 ml ze szklanymi korkami lub butlę z cienką szyjką o pojemności 250 ml ze szklanym korkiem;
 - b) Kilka butli o pojemności 2, 3 i 4 litrów do przygotowania eksperymentu i napełniania butli do BZT;
 - c) łaźnia wodna lub stała temperatura pokojowa w celu utrzymania stałej temperatury butli (± 1 °C) z wyłączeniem światła;
 - d) wyposażenie do analizy rozpuszczonego tlenu;
 - e) Filtry membranowe, 0,2–0,45 μm (nieobowiązkowe);
 - f) urządzenia do szczegółowej analizy (nieobowiązkowe).

Woda morska

12. Należy pobrać próbkę wody morskiej do dokładnie oczyszczonego pojemnika i przetransportować do laboratorium, najlepiej w ciągu jednego lub dwóch dni od pobrania. Podczas transportu temperatura próbki nie powinna znacząco przekraczać temperatury stosowanej w badaniu.
13. Należy dokładnie zidentyfikować miejsce pobrania próbki i opisać je pod względem poziomu zanieczyszczenia i składników odżywczych. W szczególności w przypadku wód przybrzeżnych lub zanieczyszczonych należy uwzględnić w tej charakterystyce liczbę kolonii drobnoustrojów cudzożywnych i określenie stężeń rozpuszczonych azotanów, związków amonu i fosforanów.
14. W odniesieniu do samej próbki wody morskiej należy podać następujące informacje:
 - data pobrania;
 - głębokość pobrania;
 - wygląd próbki – mętna itd.;
 - temperatura w czasie pobrania;
 - zasolenie;
 - rozpuszczony węgiel organiczny (DOC);
 - upływ czasu między pobraniem i wykorzystaniem w badaniu.
15. Jeżeli zawartość rozpuszczonego węgla organicznego w próbce okaże się duża lub jeżeli uzna się, że BZT ślepej próby po 28 dniach wynosiłoby więcej niż 30 % BZT substancji odniesienia, zaleca się starzenie wody morskiej co najmniej przez tydzień.
16. Podczas starzenia wodę przechowywać w warunkach tlenowych w temperaturze badania i bez dostępu światła lub w rozproszonym świetle. W razie potrzeby należy utrzymać warunki tlenowe zapewniając delikatne napowietrzanie. Podczas starzenia wody zmniejsza się zawartość łatwo rozkładających się substancji organicznych. W badaniu międzylaboratoryjnym (3) nie wykazano żadnej różnicy między potencjałem degradacji postarzonych próbek wody morskiej i świeżo pobranych próbek.
17. Przed użyciem należy wstępnie oczyścić wodę morską, usuwając duże cząstki, np. filtrując przez filtr nylonowy lub przez zgrubny filtr papierowy (nie przez filtry membranowe lub filtry GF/C) bądź stosując sedimentację i dekantację. Zastosowaną procedurę należy podać w sprawozdaniu. Wstępne oczyszczanie należy przeprowadzić po starzeniu wody, jeżeli ta procedura została zastosowana.

Roztwory podstawowe dla mineralnych składników odżywczych

18. Przygotować następujące roztwory podstawowe, stosując odczynniki do analiz.

a)	Diwodoroortofosforan potasu, KH_2PO_4	8,50 g
	Monowodoroortofosforan dipotasu, K_2HPO_4	21,75 g
	Dwuwodny wodoroortofosforan disodu, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
	Chlorek amonu, NH_4Cl	0,50 g
	Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.	
b)	Chlorek wapnia, CaCl_2	27,50 g
	Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.	

- c) Siedmiowodny siarczan magnezu, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g
Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.
- d) Sześciowodny chlorek żelaza(III), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
Rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą destylowaną.

Można uniknąć strącania w roztworze d), dodając jedną kroplę stężonego HCl albo 0,4 g kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA, sól dwusodowa) na litr. Jeżeli w roztworze podstawowym powstanie zawiesina, należy zastąpić go świeżo przygotowanym roztworem.

Przygotowanie środowiska badania

19. Należy dodać 1 ml każdego z powyższych roztworów podstawowych na każdy litr wstępnie oczyszczonej wody morskiej. Należy nasycić środowisko badania powietrzem o temperaturze badania, napowietrzając je w tym celu czystym sprężonym powietrzem przez około 20 minut. Należy oznaczyć stężenie rozpuszczonego tlenu do celów kontrolnych. Nasyczone stężenie rozpuszczonego tlenu, będące funkcją zasolenia i temperatury, można odczytać z nomogramu dołączonego do niniejszej metody badawczej (dodatek 4).

Inokulum

20. Nie dodawać konkretnego inokulum w celu uzupełnienia mikroorganizmów już obecnych w wodzie morskiej. Należy określić (nieobowiązkowo) liczbę organizmów cudzożywnych tworzących kolonie w środowisku badania z wody morskiej (a najlepiej również w początkowej próbce wody morskiej), np. przez liczbę kolonii na agarze morskim. Jest to szczególnie pożądane w przypadku próbek z terenów przybrzeżnych lub zanieczyszczonych. Sprawdzić aktywność mikroorganizmów cudzożywnych w wodzie morskiej, przeprowadzając badanie z substancją odniesienia.

Przygotowanie butelek badawczych

21. Przeprowadzić wszystkie niezbędne operacje, w tym starzenie i wstępne oczyszczanie wody morskiej w wybranej temperaturze badania wynoszącej 15–20 °C, zapewniając czystość, ale nie sterylność wszystkich naczyń szklanych.
22. Przygotować grupy butli do BZT w celu oznaczenia biochemicznego zapotrzebowania na tlen substancji badanej i substancji odniesienia w równoległych seriach doświadczalnych. Wszystkie analizy należy wykonywać w duplikacie (ślepe próby, substancja odniesienia i substancja badana), tj. dla każdego oznaczenia należy przygotować po dwie butle. Wykonać analizy co najmniej w dniach 0, 5, 15 i 28 (cztery oznaczenia). W przypadku analiz tlenu dla potrzeb czterech oznaczeń wymagana jest całkowita liczba butli $3 \times 2 \times 4 = 24$ (ślepe próby, substancja odniesienia i substancja badana), czyli około 8 litrów środowiska badania (dla jednego stężenia badanej substancji).
23. Przygotować oddzielne roztwory substancji badanej i substancji odniesienia w dużych butlach o wystarczającej objętości (pkt 11), najpierw dodając substancję badaną i substancję odniesienia, bezpośrednio lub z wykorzystaniem stężonego roztworu podstawowego, do częściowo napełnionych dużych butli. Dodać większą ilość środowiska badania w celu uzyskania ostatecznegożądanego stężenia. Jeżeli stosuje się roztwory podstawowe badanej substancji lub substancji odniesienia, upewnić się, czy zasolenie środowisko wody morskiej nie uległo znacznej zmianie.
24. Wybrać stężenia badanej substancji i substancji odniesienia, uwzględniając:
 - a) rozpuszczalność tlenu w wodzie morskiej w warunkach występujących w badaniu temperatury i zasolenia (zob. nomogram w dodatku 4);
 - b) ślepe próby BZT wody morskiej; oraz
 - c) oczekiwaną biodegradowalność badanej substancji.
25. W temperaturze 15 °C i 20 °C oraz przy zasoleniu (woda oceaniczna) wynoszącym 32 cząstki na 1 000 rozpuszczalność tlenu wynosi odpowiednio około 8,1 i 7,4 mg/l. Jeżeli woda morska nie jest postarzona, zapotrzebowanie na tlen w samej wodzie morskiej (oddychanie w ślepej próbce) może wynosić 2 mg O_2 /l lub więcej. W związku z tym, aby zapewnić znaczące stężenie tlenu po utlenieniu badanej substancji, należy wykorzystać stężenie początkowe badanej substancji, wynoszące około 2–3 mg/l (w zależności od TZT) w przypadku substancji, które mają ulec całkowitej degradacji w warunkach badania (takich jak substancje odniesienia). Słabo rozpuszczalne substancje należy badać w wyższych stężeniach, do około 10 mg/l, pod warunkiem że nie występują skutki toksyczne. Korzystne może być przeprowadzenie badań równoległych z niskim (około 2 mg/l) i wysokim (około 10 mg/l) stężeniem badanej substancji.

26. Należy równolegle oznaczyć ślepą próbę tlenową w butlach niezawierających ani substancji badanej, ani substancji odniesienia.
27. W celu oznaczenia działania hamującego należy przygotować następujące serie roztworów w oddzielnych dużych butlach (pkt 13):
- a) 2 mg na litr substancji ulegającej łatwo degradacji, np. którejkolwiek ze wspomnianych substancji odniesienia;
 - b) x mg na litr badanej substancji (x zwykle wynosi 2);
 - c) 2 mg na litr łatwo rozkładającej się substancji plus x mg na litr badanej substancji.

Fizykochemiczna próba kontrolna (nieobowiązkowa)

28. Jeżeli wykorzystuje się opcję szczegółowych analiz, można przeprowadzić badanie fizykochemiczne w celu sprawdzenia, czy badana substancja jest usuwana w wyniku mechanizmów abiotycznych, takich jak hydroliza i adsorpcja. Fizykochemiczną próbę kontrolną można wykonać dodając chlorek rtęci(II) (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50–100 mg/l) do kolb w duplikacie zawierających badaną substancję w celu zatrzymania aktywności mikrobiologicznej. Znaczące obniżenie specyficznego stężenia substancji w trakcie badania wskazuje na występowanie abiotycznych mechanizmów usuwania.

Liczba butli do badania BZT w typowej analizie

29. W typowej analizie stosuje się następujące butle:
- co najmniej 8 butli zawierających badaną substancję;
 - co najmniej 8 butli zawierających samą wodę morską wzbogaconą o składniki odżywcze;
 - co najmniej 8 butli zawierających substancję odniesienia oraz, w razie potrzeby,
 - 6 butli zawierających substancję badaną i substancję odniesienia (próby kontrolne toksyczności).

PROCEDURA

30. Po przygotowaniu natychmiast zasyfonować każdy roztwór z dolnej ćwiartki (nie z dna) właściwej dużej butli w celu napełnienia odpowiedniej grupy butli do badania BZT. Należy natychmiast przeprowadzić analizę zerowych prób kontrolnych (czas zero) pod kątem zawartości rozpuszczonego tlenu (pkt 33) lub zachować je w celu dalszej analizy chemicznej przez strącenie za pomocą MnCl_2 (chlorek manganu(II)) i NaOH (wodorotlenek sodu).
31. Pozostałe równoległe butle do badania BZT należy inkubować w temperaturze badania (15–20 °C), przechowywać bez dostępu światła i usuwać z miejsca inkubacji w odpowiednich odstępach czasu (np. co najmniej po 5, 15 i 28 dniach), wykonując analizę na zawartość rozpuszczonego tlenu (pkt 33).
32. W celu przeprowadzenia szczegółowych analiz (nieobowiązkowe) należy poddać próbki filtracji na filtrze membranowym (0,2–0,45 μm) lub odwirowywać je przez 15 minut. Przechowywać próbki przez okres nie dłuższy niż 48 godzin w temperaturze 2–4 °C lub przez dłuższe okresy w temperaturze – 18 °C, jeżeli analiza nie jest wykonywana natychmiast (jeżeli wiadomo, że w badanej substancji nie nastąpią zmiany, należy zakwaśnić ją do pH 2 przed przechowywaniem).

Oznaczenie rozpuszczonego tlenu

33. Stężenie rozpuszczonego tlenu należy oznaczyć metodą chemiczną lub elektrochemiczną, uznaną na poziomie krajowym lub międzynarodowym.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

34. Wyniki analiz należy wpisać do załączonej karty charakterystyki (dodatek 5).

⁽¹⁾ Chlorek rtęci(II) (HgCl_2) jest bardzo toksyczną substancją, wymagającą zachowania odpowiednich środków ostrożności. Uwodnione odpady, zawierające tę substancję chemiczną, należy usuwać we właściwy sposób; nie wolno odprowadzać ich bezpośrednio do kanalizacji ściekowej.

35. Obliczyć biochemiczne zapotrzebowanie na tlen jako różnicę w ubytku tlenu między ślepą próbą i roztworem badanej substancji w warunkach badania. Podzielić ubytek tlenu netto przez stężenie (w/v) substancji w celu wyrażenia biochemicznego zapotrzebowania na tlen jako mg BZT na mg badanej substancji. Degradację określa się jako stosunek biochemicznego zapotrzebowania na tlen najlepiej do teoretycznego zapotrzebowania na tlen (TZT) albo do chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) i wyraża jako procent (zob. pkt 36).
36. Obliczyć wartości biodegradacji dla każdego czasu pobrania próbek zarówno dla substancji badanej, jak i dla substancji odniesienia za pomocą jednego z równań:

$$\% \text{ biodegradacji} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg badanej substancji}}{\text{mg TZT}/\text{mg badanej substancji}} \times 100$$

$$\% \text{ biodegradacji} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg badanej substancji}}{\text{mg ChZT}/\text{mg badanej substancji}} \times 100$$

gdzie:

TZT = teoretyczne zapotrzebowanie na tlen (obliczenia w dodatku 3)

ChZT = chemiczne zapotrzebowanie na tlen oznaczone doświadczalnie.

Uwaga: niekiedy te dwa sposoby obliczania (procent TZT lub procent ChZT) nie dają takich samych wyników; lepiej jest stosować TZT, ponieważ w badaniu ChZT niektóre substancje nie utleniają się całkowicie.

37. Przebieg degradacji należy zilustrować graficznie na diagramie (zob. przykład w sekcji »Ważność i interpretacja wyników«). Jeżeli dostępne są wystarczające dane, z krzywej biodegradacji należy wyznaczyć fazę zwłoki (t_l) i czas od zakończenia fazy zwłoki (t_{50}) potrzebny do osiągnięcia 50 % usunięcia.
38. Jeżeli stosuje się szczegółową analizę (nieobowiązkową), należy podać procent pierwotnej degradacji jako procent usuwania konkretnej substancji w czasie trwania badania (skorygowany dla celów analitycznej próby ślepej).

Sprawozdanie z badania

39. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- cechy fizyczne, oraz, w stosownych przypadkach, właściwości fizykochemiczne;
- dane dotyczące tożsamości.

Warunki badania:

- lokalizacja i opis pobrania próbki; ocena poziomu zanieczyszczenia i składników odżywczych (liczba kolonii, azotany, związki amonu, fosforany, w stosownych przypadkach);
- charakterystyka próbki (data pobrania próbki, głębokość, wygląd, temperatura, zasolenie, rozpuszczony węgiel organiczny (nieobowiązkowe), upływ czasu od pobrania do użycia w badaniu);
- metoda (jeśli została zastosowana) do starzenia wody morskiej;
- metoda wstępnego oczyszczania (filtracja/sedymentacja) wody morskiej;
- metoda oznaczania ChZT (jeżeli zostało wykonane);
- metoda pomiarów tlenu;
- procedura dyspersji w przypadku substancji, które są trudno rozpuszczalne w warunkach badania;
- metoda zastosowana do oznaczania liczby organizmów cudzożywnych w wodzie morskiej (liczba drobnoustrojów lub inna procedura);

- metoda zastosowana do oznaczania rozpuszczonego węgla organicznego w wodzie morskiej (nieobowiązkowe);
- metoda zastosowana do szczegółowej analizy (nieobowiązkowa);
- inne nieobowiązkowe metody zastosowane w celu scharakteryzowania wody morskiej (pomiar ATP itd.).

Wyniki:

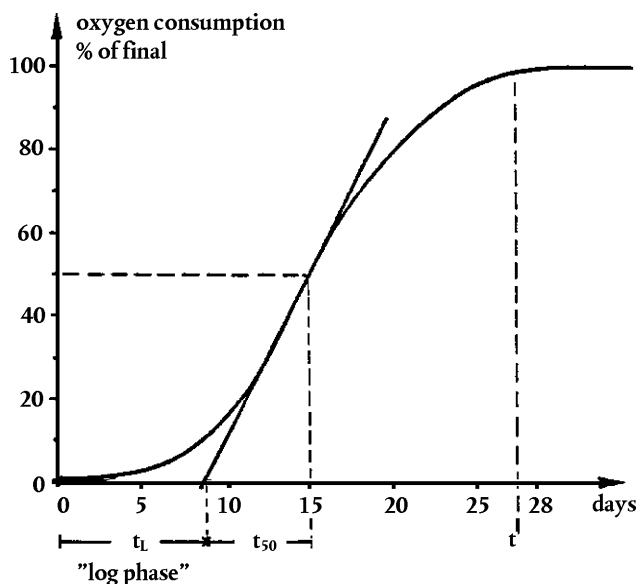
- dane analityczne zamieszczone w karcie charakterystyki (załączonej w dodatku 5);
- przebieg badania degradacji przedstawiony graficznie na diagramie pokazującym fazę zwłoki (t_L), kąt nachylenia krzywej i czas (od zakończenia fazy zwłoki) potrzebny do osiągnięcia 50 % ostatecznej absorpcji tlenu spowodowanej utlenianiem badanej substancji (t_{50}). Fazę zwłoki można oszacować graficznie, jak pokazano na załączonym rysunku, lub odpowiednio przyjąć jako czas potrzebny do osiągnięcia degradacji na poziomie 10 %;
- procent degradacji zmierzony po 28 dniach.

Omówienie wyników.

Ważność i interpretacja wyników

40. Samo oddychanie w ślepej próbie nie powinno przekroczyć zużycia 30 % tlenu w butelce badawczej. Jeżeli nie można spełnić tego kryterium przy użyciu świeżo pobranej wody morskiej, wodę morską należy przed wykorzystaniem poddać procesowi starzenia (ustabilizować).
41. Należy uwzględnić możliwość, że substancje zawierające azot mogą wpłynąć na wyniki.
42. Wyniki otrzymane w przypadku substancji odniesienia, tj. benzoenu sodu i aniliny, powinny być porównywalne z wynikami otrzymanymi w badaniu międzylaboratoryjnym (3) (pkt 9). Jeżeli wyniki otrzymane z zastosowaniem substancji odniesienia są nietypowe, badanie należy powtórzyć, wykorzystując inną próbkę wody morskiej.
43. Badaną substancję można uznać za hamującą rozwój bakterii (przy zastosowanym stężeniu), jeżeli biochemiczne zapotrzebowanie na tlen w mieszaninie substancji odniesienia i substancji badanej wynosi mniej niż suma biochemicznego zapotrzebowania na tlen w oddzielnych roztworach tych dwóch substancji.
44. W związku z tym, że badane stężenia są stosunkowo wysokie w porównaniu do większości naturalnych systemów, a w konsekwencji stosunek stężenia badanych substancji do innych źródeł węgla jest niekorzystny, metodę tę należy uważać za badanie wstępne, które można wykorzystać jako wskazanie, czy dana substancja łatwo ulega biodegradacji. Zatem niski wynik niekoniecznie oznacza, że badana substancja nie ulega biodegradacji w środowiskach morskich, lecz wskazuje, że potrzeba będzie więcej pracy, aby to ustalić.

Poniżej podano przykład teoretycznego eksperymentu z degradacją, ilustrujący wykonalny sposób oszacowania wartości t_L (długość »fazy zwłoki«) i przedziału czasowego t_{50} (rozpoczynającego się w momencie t_L) potrzebny do osiągnięcia 50 %, ostatecznej absorpcji tlenu spowodowanej utlenianiem badanej substancji:



BIBLIOGRAFIA

- (1) de Kreuk J.F. i Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.
 - (2) Rozdział C.4-B niniejszego załącznika: Oznaczenie szybkiej biodegradowalności, część III zmodyfikowanego badania przesiewowego OECD.
 - (3) Nyholm N. i Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Sprawozdanie końcowe z programu badań międzylaboratoryjnych 1984-1985, marzec 1987, Komisja Wspólnot Europejskich.
 - (4) Rozdział C.11 niniejszego załącznika: Biodegradacja – osad czynny, badanie hamowania oddychania.
 - (5) Rozdział C.4-E niniejszego załącznika: Oznaczenie szybkiej biodegradowalności, część VI. Badanie metodą zamkniętej butli.
-

Dodatek 1

Oznaczanie węgla organicznego w wodzie morskiej**METODA WYTRZĄSANIA W KOLBIE**

W celu oznaczenia węgla organicznego w próbce wody związki organiczne w próbce utlenia się do dwutlenku węgla, stosując zwykle jedną z następujących trzech technik:

- utlenianie na mokro nadsiarczanem/promieniowaniem UV;
- utlenianie na mokro nadsiarczanem/w podwyższonej temperaturze (116–130 °C);
- spalanie.

Powstały CO₂ oznacza się, stosując spektrofotometrię w podczerwieni lub miareczkowanie. Ewentualnie redukuje się CO₂ do metanu, który oznacza się w detektorze płomiennie-jonizacyjnym.

Metodę oznaczania nadsiarczanem/promieniowaniem UV stosuje się powszechnie do analizy »czystej« wody z małą zawartością cząstek stałych. Te dwie ostatnie metody można stosować w przypadku większości rodzajów próbek wody, przy czym metoda utleniania nadsiarczanem/w podwyższonej temperaturze jest najodpowiedniejsza w odniesieniu do próbek niskopoziomowych, a technikę spalania stosuje się do próbek o zawartości nielotnego węgla organicznego przewyższającej znacznie 1 mg C/l.

Zakłócenia

Wszystkie trzy metody są zależne od wydzielania lub kompensowania węgla nieorganicznego obecnego w próbce. Oczyszczanie zakwaszonej próbki z CO₂ to najczęściej stosowana metoda eliminowania węgla nieorganicznego, choć prowadzi to również do strat lotnych związków organicznych (1). Należy zapewnić całkowite wyeliminowanie lub skompensowanie węgla nieorganicznego dla matrycy każdej próbki, a lotny węgiel organiczny należy oznaczyć wraz z nielotnym węglem organicznym, w zależności od rodzaju próbki.

Wysokie stężenia chloru prowadzą do obniżenia efektywności utleniania w przypadku stosowania metody z nadsiarczanem/promieniowaniem UV (2). Zastosowanie odczynnika utleniającego zmodyfikowanego dodatkiem azotanu rtęci(II) może jednak wyeliminować to zakłócenie. Zaleca się zastosowanie maksymalnej tolerowanej objętości próbki w celu dokonania oceny każdego rodzaju próbki zawierającej chlor. Wysokie stężenia soli w próbce poddanej analizie metodą spalania mogą spowodować pokrywanie katalizatora solą i nadmierne działanie żrące w rurze do spalań. Należy podjąć środki ostrożności zgodnie z instrukcją obsługi producenta.

Próbki o dużej mętności, jak również próbki zawierające cząstki stałe, można utlenić w sposób niepełny, stosując metodę z nadsiarczanem/promieniowaniem UV.

Przykład odpowiedniej metody

Nielotny węgiel organiczny oznacza się przez utlenianie nadsiarczanem/ promieniowaniem UV, a następnie ilościowe oznaczenie wydzielonego CO₂ za pomocą bezdyspersyjnej spektrometrii w podczerwieni.

Odczynnik utleniający modyfikuje się zgodnie z sugestiami podanymi w (2), jak opisano w instrukcji obsługi producenta:

- a) 8,2 g HgCl₂ i 9,6 g Hg(NO₃)₂ · H₂O rozpuszcza się w kilkuset mililitrach wody odczynnikowej o niskim stężeniu węgla;
- b) 20 g K₂S₂O₈ rozpuszcza się w roztworze z solą rtęci;
- c) do mieszaniny dodaje się 5 ml HNO₃ (stężonego);
- d) odczynnik rozcieńcza się do 1 000 ml;

Zakłócenie spowodowane przez chlor eliminuje się, stosując objętość próbki 40 µl w przypadku 10 % chlorku i objętość próbki 200 µl w przypadku 1,9 % chlorku. Próbkę o wysokich stężeniach chlorku lub większej objętości można analizować tą metodą, pod warunkiem że zapobiega się akumulacji chlorku w naczyniu do utleniania. Następnie można dokonać w razie potrzeby oznaczenia lotnego węgla organicznego w odniesieniu do danego typu próbki.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16 stycznia 1986 r.
- (2) Amerykańskie Stowarzyszenia Zdrowia Publicznego (APHA), Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. Amerykańskie Stowarzyszenie Przedsiębiorstw Wodnych (AWWA) oraz Federacja Kontroli Zanieczyszczeń Wód, wydanie 16., 1985.

Również istotne (przedstawia opis systemu autoanalizy):

- (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.

Dodatek 2

Biodegradacja w wodzie morskiej

METODA WYTRZĄSANIA W KOLBIE

KARTA CHARAKTERYSTYKI

1. **LABORATORIUM:**
2. **DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA:**
3. **BADANA SUBSTANCJA:**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: mg/l jako substancja

Początkowe stężenie, w pożywce t_0 : mg/l jako substancja

: mg rozpuszczonego węgla organicznego/l

4. **WODA MORSKA:**

Źródło:

Data pobrania:

Głębokość pobrania:

Wygląd w momencie pobrania (np. mętna itd.):

Zasolenie w momencie pobrania: ‰

Temperatura w momencie pobrania: °C

rozpuszczony węgiel organiczny po »x« godzinach od pobrania: mg/l

Wstępna obróbka przed badaniem (np. filtrowanie, sedymentacja, starzenie itp.):

Liczba kolonii — próbka oryginalna: kolonie/ml

— na początku badania: kolonie/ml

Inne cechy charakterystyczne:

5. OZNACZENIA WĘGLA:

Analizator węgla:

	Kolba nr		rozpuszczony węgiel organiczny po n dniach (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	x
Badanie: woda morską wzmocnioną składnikami odżywczymi z badaną substancją	1	a ₁					
		a ₂					
		średnia, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		średnia, C _{b(t)}					
Ślepa próba: woda morską wzmocnioną składnikami odżywczymi bez badanej substancji	1	c ₁					
		c ₂					
		średnia, C _{c(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		średnia, C _{d(t)}					
	średnia, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. OCENA DANYCH PIERWOTNYCH:

Nr kolby	Obliczanie wyników	% degradacji po n dniach				
		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				
średnia arytmetyczna (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Nie należy uśredniać D₁ i D₂, jeżeli istnieje między nimi znacząca różnica.

Uwaga: podobne wzory można zastosować, gdy po degradacji wykonywana jest szczegółowa analiza oraz w przypadku substancji odniesienia i prób kontrolnych toksyczności.

7. **DEGRADACJA ABIOTYCZNA (nieobowiązkowa)**

	Czas (dni)	
	0	t
stężenie rozpuszczonego węgla organicznego (mg/l) w sterylnych próbach kontrolnych	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

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

Dodatek 3

Obliczanie teoretycznego biochemicznego zapotrzebowania na tlen

METODA »ZAMKNIĘTEJ BUTLI«

TZT substancji $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ o masie cząsteczkowej MW oblicza się zgodnie z:

$$TZT_{NH3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

Obliczenie to sugeruje, że C ulega mineralizacji do CO_2 , H do H_2O , P do P_2O_5 a Na do Na_2O . Halogen zostaje usunięty jako halogenowodor, a azot jako amoniak.

Przykład:

Głukoza $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$TZT = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg glukozy}$$

Masy cząsteczkowe soli innych niż sole metali alkalicznych oblicza się przy założeniu, że sole uległy hydrolizie.

Zakłada się, że siarka utlenia się do siarki sześciowartościowej.

Przykład:

n-dodecylobenzenosulfonian sodu $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$TZT = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg substancji}$$

W przypadku substancji zawierających azot można go usunąć jako amoniak, azotyn lub azotan, odpowiadający różnym biochemicznym zapotrzebowaniom na tlen.

$$TZT_{NO2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

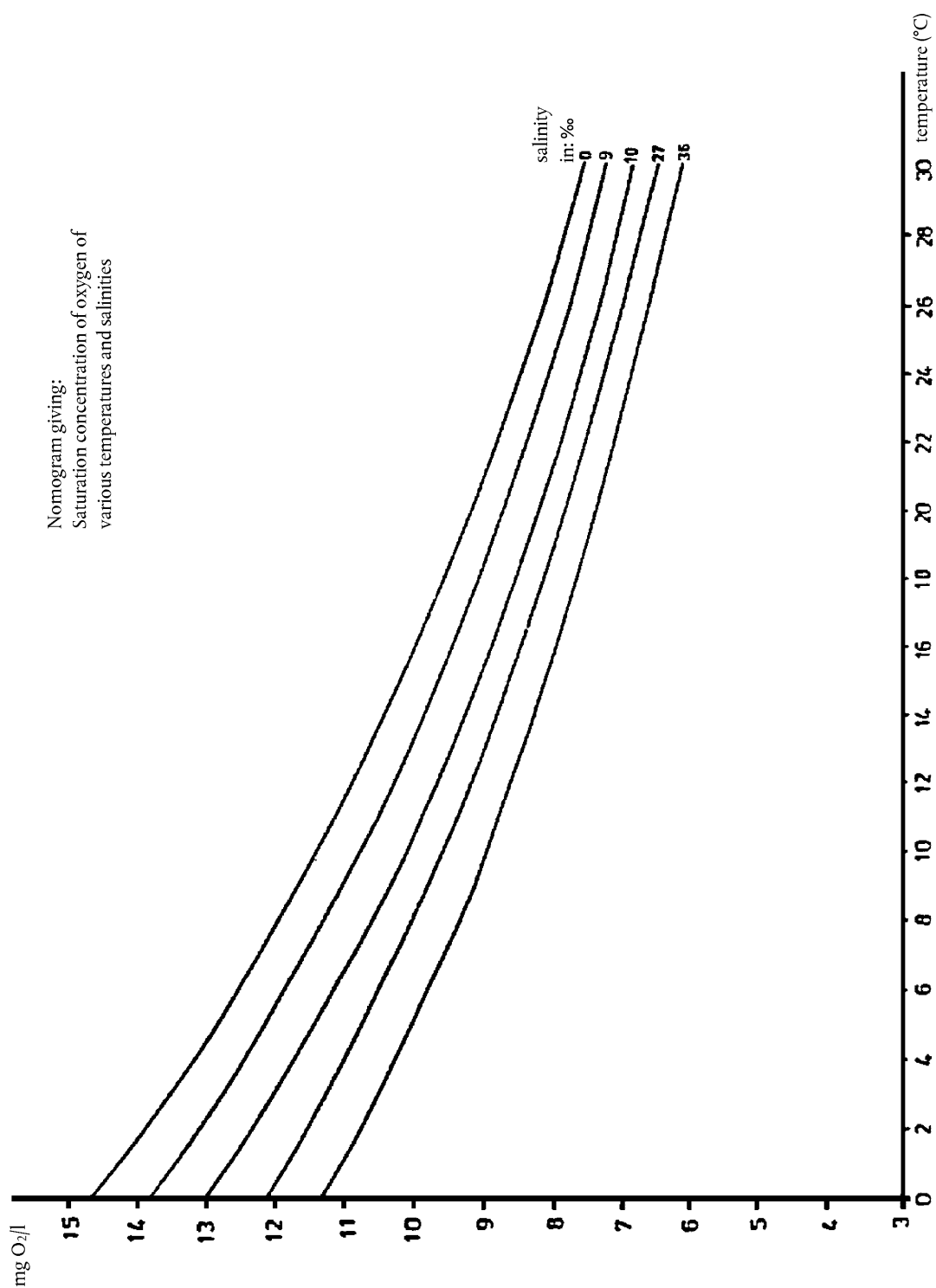
$$TZT_{NO3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

Założmy, że w przypadku amin drugorzędowych analiza wykazała pełne tworzenie się azotanów:

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

$$TZT_{NO3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg substancji}$$

Dodatek 4



Dodatek 5

Biodegradacja w wodzie morskiej

METODA »ZAMKNIĘTEJ BUTLI«

KARTA CHARAKTERYSTYKI

1. **LABORATORIUM:**
2. **DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA:**
3. **BADANA SUBSTANCJA:**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: mg/l
 Stężenie początkowe w środowisku wody morskiej: mg/l
 TZT lub ChZT mg O₂/mg substancji badanej

4. **WODA MORSKA:**

Źródło:

Data pobrania:

Głębokość pobrania:

Wygląd w momencie pobrania (np. mętna itd.):

Zasolenie w momencie pobrania: ‰
 Temperatura w momencie pobrania: °C
 rozpuszczony węgiel organiczny po »x« godzinach od pobrania: mg/l

Wstępna obróbka przed badaniem (np. filtrowanie, sedimentacja, starzenie itp.):

Liczba kolonii — próbka oryginalna: kolonie/ml
 — na początku badania: kolonie/ml

Inne cechy charakterystyczne:

5. **ŚRODOWISKO BADANIA:**

Temperatura po napowietrzeniu: °C
 Stężenie O₂ po napowietrzeniu i sytuacja przed rozpoczęciem badania: mg O₂/l

6. **OZNACZENIE STĘŻENIA ROZPUSZCZONEGO TLENU:**

Metoda: Winkler/elektrodowa

	Kolba nr		mg O ₂ /l po n dniach			
			0	5	15	28
Badanie: woda morska wzmocniona składnikami odżywczymi z badaną substancją	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Średnia arytmetyczna badania	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Kolba nr		mg O ₂ /l po n dniach			
			0	5	15	28
Ślepa próba: składnik odżywczy – zanieczyszczona woda morska, bez badanej substancji	1	c ₁				
	2	c ₂				
	średnia arytmetyczna ślepej próby	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Uwaga: podobny wzór może być stosowany dla substancji odniesienia i prób kontrolnych toksyczności.

7. ZANIKANIE STĘŻENIA ROZPUSTCZONEGO TLENU: % DEGRADACJI:

	Zanikanie stężenia rozpuszczonego tlenu po n dniach		
	5	15	28
$(m_b - m_t)^{(1)}$			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)^{(1)}}{\text{badana substancja (mg/l)} \times TZT} \times 100$			

⁽¹⁾ Zakłada się, że $m_{b(0)} = m_{t(0)}$, przy czym

$m_{b(0)}$ = wartość ślepej próby w dniu 0,

$m_{t(0)}$ = wartość badanej substancji w dniu 0.

Jeżeli $m_{b(0)}$ nie jest równe $m_{t(0)}$, zastosować $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$, przy czym

$m_{b(x)}$ = wartość ślepej próby w dniu x,

$m_{t(x)}$ = wartość badanej substancji w dniu x.

C.43. BIODEGRADOWALNOŚĆ BEZTLENOWA SUBSTANCJI ORGANICZNYCH W PRZEFERMENTOWANYM OSADZIE: ZA POMOCĄ POMIARU WYTWARZANEGO GAZU**WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 311 (2006 r.) w sprawie badań. Istnieje wiele badań umożliwiających ocenę biodegradowalności tlenowej substancji organicznych (metody badawcze C.4, C.9, C.10, i C.11 (1) oraz wytyczna OECD nr 302C w sprawie badań (2)), a wyniki ich stosowania wykorzystano z powodzeniem w celu przewidywania losów substancji w środowisku aerobowym, w szczególności podczas tlenowych etapów oczyszczania ścieków. Tlenowemu rozkładowi ulegają również w różnych proporcjach substancje nierozpuszczalne w wodzie, jak również te, które ulegają adsorpcji na substancjach stałych w ściekach, ponieważ występują w zdekantowanych ściekach. Większe frakcje tych substancji są jednak związane ze wstępnie osadzonym osadem, który jest oddzielony od surowych ścieków w osadnikach zanim zdekantowane ścieki, czyli supernatant, zostaną poddane oczyszczaniu w warunkach aerobowych. Osad zawierający niektóre substancje rozpuszczalne w płynie porowym przekierowuje się do podgrzewanych komór fermentacyjnych w celu poddania ich procesowi fermentacji beztlenowej. Na razie w tej serii nie ma badań umożliwiających ocenę biodegradowalności beztlenowej w beztlenowych komorach fermentacyjnych i niniejsze badanie zaprojektowano, aby wypełnić tę lukę; nie musi ono mieć zastosowania do innych beztlenowych elementów środowiska.
2. W celu oceny biodegradowalności beztlenowej zastosowano z powodzeniem metody respirometryczne wykorzystywane do pomiaru ilości wytworzonego gazu, głównie metanu (CH_4) i dwutlenku węgla (CO_2) w warunkach beztlenowych. Birch et al (3) dokonali przeglądu tych procedur i doszli do wniosku, że prace Sheltona i Tiedje (4) oparte na wcześniejszych badaniach (5)(6)(7) były najbardziej wyczerpujące. Metoda (4), nad którą inni kontynuowali prace (8) i która stała się amerykańską normą (9)(10), nie rozwiązywała problemów związanych z różną rozpuszczalnością CO_2 i CH_4 w środowisku badania i z obliczaniem teoretycznego wytwarzania gazu przez badaną substancję. W raporcie ECETOC (3) zalecono dodatkowy pomiar zawartości rozpuszczonego węgla nieorganicznego w supernatancie, co sprawiło, że technika ta znalazła szersze zastosowanie. Metoda ECETOC została poddana międzynarodowej próbniej kalibracji (badaniu międzylaboratoryjnego) i stała się normą ISO 11734 (11).
3. Niniejsza metoda badawcza, oparta na normie ISO 11734 (11), opisuje metodę badania przesiewowego mającego na celu ocenę potencjalnej beztlenowej biodegradowalności substancji organicznych w szczególnych warunkach (tj. w beztlenowej komorze fermentacyjnej w danym czasie i danym zakresie stężenia mikroorganizmów). Ponieważ rozcieńczony osad jest stosowany przy stosunkowo wysokim stężeniu badanej substancji, a czas trwania badania jest zwykle dłuższy niż czas retencji w beztlenowych komorach fermentacyjnych, warunki badania niekoniecznie muszą odpowiadać warunkom panującym w beztlenowych komorach fermentacyjnych i nie mają też zastosowania do oceny biodegradowalności beztlenowej substancji organicznych w innych warunkach środowiskowych. Osad poddaje się narażeniu na działanie badanej substancji przez okres do 60 dni, co przekracza zwykły czas retencji osadu (25–30 dni) w beztlenowych komorach fermentacyjnych, choć czas retencji w obiektach przemysłowych może być znacznie dłuższy. Nie można sformułować równie przekonujących prognoz na podstawie wyników tego badania jak w przypadku biodegradacji tlenowej, ponieważ zgromadzone dowody dotyczące zachowania substancji badanych w »szybkich« badaniach tlenowych i w badaniach symulacyjnych oraz w środowisku tlenowym wystarczają, aby mieć pewność, że istnieje powiązanie; w przypadku środowiska beztlenowego istnieje niewiele podobnych dowodów. Można założyć, że całkowita biodegradacja beztlenowa zachodzi wówczas, gdy teoretyczne wytwarzanie gazu osiągnie poziom 75–80 %. Wysokie wartości stosunku substancji do biomasy zastosowane w niniejszym badaniu oznaczają, że substancja, która przechodzi dalej, będzie bardziej podatna na degradację w beztlenowej komorze fermentacyjnej. Ponadto substancje, które nie przekształcają się w gaz podczas badania, nie muszą wcale utrzymywać się przy wartościach stosunku substancji do biomasy w bardziej realnych warunkach środowiskowych. Zachodzą również inne reakcje beztlenowe, w których substancje mogą ulec co najmniej częściowej degradacji, np. w wyniku odchlorowania, jednak w tym badaniu nie wykrywa się takich reakcji. Stosując specjalne metody analityczne w celu oznaczenia badanej substancji, można jednak monitorować jej zniknięcie (zob. pkt 6, 30, 44 i 53).

ZASADA BADANIA

4. Wyplukany przefermentowany osad⁽¹⁾ zawierający niskie (< 10 mg/l) stężenia węgla nieorganicznego rozcieńcza się w przybliżeniu dziesięciokrotnie do całkowitego stężenia zawiesiny ogólnej 1 g/l–3 g/l i

⁽¹⁾ Przefermentowany osad to mieszanina osadu ściekowego powstałego w wyniku procesu osadzenia i osadu czynnego, którą inkubowano w beztlenowej komorze fermentacyjnej w temperaturze około 35 °C w celu zredukowania biomasy i zapachu oraz poprawienia parametrów odwadniania osadu. Składa się z połączenia beztlenowych bakterii fermentacyjnych i bakterii metanogennych wytwarzających dwutlenek węgla i metan (11).

inkubuje w temperaturze $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ w szczelnie zamkniętych naczyniach z badaną substancją w stężeniu 20–100 mg C/l przez okres co najmniej 60 dni. Uwzględnia się pomiar aktywności osadu wykonując równoległe ślepe próby kontrolne, w których w środowisku badania znajduje się inokulum z osadu, ale bez badanej substancji.

5. Mierzy się wzrost ciśnienia fazy gazowej w naczyniach związany z wytwarzaniem dwutlenku węgla i metanu. W warunkach badania znaczna część wytworzonego CO_2 zostanie rozpuszczona w fazie ciekłej albo przekształcona w węglan lub wodorowęglan. Na końcu badania mierzy się zawartość węgla nieorganicznego.
6. Ilość węgla (nieorganicznego plus metanu) powstałego w wyniku biodegradacji badanej substancji oblicza się na podstawie ilości netto wytworzonego gazu i ilości netto węgla nieorganicznego powstałego w fazie ciekłej przekraczającej wartości w ślepych próbach kontrolnych. Zakres biodegradacji oblicza się na podstawie całkowitej ilości wytworzonego węgla nieorganicznego i węgla metanowego wyrażonej jako procent zmierzonej lub obliczonej ilości węgla dodanego jako badana substancja. Można śledzić przebieg biodegradacji, wykonując pośrednie pomiary samego wytwarzania gazu. Ponadto pierwotną biodegradację można oznaczyć, wykonując szczegółowe analizy na początku i na końcu badania.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI

7. Aby dokonać prawidłowej interpretacji wyników, należy znać cechy charakterystyczne badanej substancji, takie jak czystość, rozpuszczalność w wodzie, lotność i adsorpcja. Zawartość węgla organicznego (% w/w) badanej substancji musi być poznana na podstawie jej struktury chemicznej lub pomiaru. W przypadku lotnych badanych substancji przy podejmowaniu decyzji, czy badanie ma zastosowanie, pomocna jest zmierzona lub obliczona stała Henry'ego. Informacje na temat toksyczności badanej substancji dla bakterii beztlenowych są przydatne przy wyborze odpowiedniego badanego stężenia i przy interpretacji wyników wskazujących na słabą biodegradowalność. Zaleca się uwzględnienie próby kontrolnej z hamowaniem, chyba że wiadomo jest, że badana substancja nie jest inhibitorem aktywności mikroorganizmów beztlenowych (zob. pkt 21 i norma ISO 13641-1 (12)).

ZASTOSOWANIE METODY BADANIA

8. Metodę badawczą można stosować w przypadku substancji rozpuszczalnych w wodzie; można ją również stosować w przypadku substancji słabo rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie, pod warunkiem że stosuje się metodę dokładnego dawkowania, zob. np. norma ISO 10634 (13). Na ogół w przypadku substancji lotnych konieczne jest podejmowanie decyzji indywidualnie dla każdego przypadku. Muszą zostać podjęte specjalne środki, na przykład nieuwalnianie gazu w trakcie badania.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

9. W celu sprawdzenia procedury bada się substancję odniesienia, przygotowując równoległe odpowiednie naczynia w ramach zwykłych serii badania. Przykładami użytych substancji są: fenol, benzoetan sodu i glikol polietylenowy 400, w stosunku do których oczekuje się, że ich degradacja nastąpi w wyniku teoretycznego wytwarzania gazu (tj. metanu i węgla nieorganicznego) w ilości ponad 60 % w ciągu 60 dni (3)(14).

ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW BADAŃ

10. W międzynarodowym badaniu międzylaboratoryjnym (14) osiągnięto dobrą odtwarzalność pomiarów ciśnienia gazu między trzema naczyniami. Względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności) wynosił głównie poniżej 20 %, choć wartość ta często wzrastała do > 20 % w obecności substancji toksycznych lub pod koniec 60-dniowego okresu inkubacji. Wyższe odchylenia stwierdzono również w naczyniach o objętości < 150 ml. Ostateczne wartości pH środowiska badawczego znajdowały się w przedziale 6,5–7,0.

11. W badaniu międzylaboratoryjnym otrzymano następujące wyniki.

Badana substancja	Łączne dane n_1	Średnia degradacja (łącznych danych) (%)	Względne odchylenie standardowe (łącznych danych) (%)	Dane ważne n_2	Średnia degradacja (danych ważnych) (%)	Względne odchylenie standardowe (danych ważnych) (%)	Dane > 60 % degradacja w badaniach ważnych n_3
Kwas palmitynowy	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Glikol polietylenowy 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proporcja n_2

12. Współczynniki zmienności średniej wszystkich wartości otrzymanych z wykorzystaniem kwasu palmitynowego i glikolu polietylenowego 400 wynosiły odpowiednio 45 % ($n = 36$) i 35 % ($n = 38$). Kiedy pominięto wartości < 40 % i > 100 % (uznano, że te pierwsze wynikały z warunków gorszych od optymalnych, zaś te drugie wynikały z nieznanymi przyczyn), współczynniki zmienności obniżyły się odpowiednio do 26 % i 23 %. Odsetki »ważnych« wartości osiągających co najmniej 60 % degradacji wynosiły 70 % w przypadku kwasu palmitynowego i 83 % w przypadku glikolu polietylenowego 400. Proporcje procentowej biodegradacji z pomiarów zawartości rozpuszczonego węgla nieorganicznego były stosunkowo niskie, ale zmienne. W przypadku kwasu palmitynowego, zakres wynosił 0–35 %, średnia 12 %, a współczynnik zmienności 92 %, natomiast w przypadku glikolu polietylenowego 400 zakres wynosił 0–40 %, średnia 24 %, a współczynnik zmienności 54 %.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Aparatura

13. Wymagany jest zwykły sprzęt laboratoryjny i następujące przyrządy:

- Inkubator – iskrobezpieczny z regulacją temperatury $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- Szklane naczynia badawcze odporne na ciśnienie o odpowiednich nominalnych wymiarach ⁽¹⁾, każde z nich wyposażone w gazoszczelny korek, który może wytrzymać ciśnienie około 2 barów. Faza gazowa powinna stanowić od około 10 % do 30 % całkowitej objętości. Jeżeli biogaz jest uwalniany regularnie, około 10 % objętości fazy gazowej jest odpowiednie, jednak jeżeli uwolnienie gazu zachodzi tylko na końcu badania, odpowiednie jest 30 %. Szklane butelki do surowicy o pojemności nominalnej 125 ml i objętości całkowitej około 160 ml, zamknięte szczelnymi korkami ⁽²⁾ i obciskanymi pierścieniami aluminiowymi zaleca się w przypadkach, gdy następuje spadek ciśnienia przy każdym pobieraniu próbek;
- Urządzenie do pomiaru ciśnienia ⁽³⁾ dostosowane w sposób umożliwiający pomiar i upuszczanie wytworzonego gazu, na przykład ręczny precyzyjny ciśnieniomierz podłączony do odpowiedniej igły do strzykawki; gazoszczelny zawór 3-drogowy ułatwia obniżenie nadmiernego ciśnienia (dodatek 1). Wewnętrzna objętość przewodów przetwornika ciśnienia i zaworu powinna być jak najmniejsza, aby błędy wynikające z pominięcia objętości aparatury były niewielkie;

⁽¹⁾ Zalecana pojemność to 0,1–1 litra.

⁽²⁾ Zaleca się stosowanie gazoszczelnych korków silikonowych. Zaleca się również przetestowanie gazoszczelności korków, w szczególności butylowych korków gumowych, ponieważ niektóre korki dostępne w handlu nie są wystarczająco gazoszczelne w przypadku metanu, a niektóre korki nie zachowują szczelności, kiedy przekłuje się je igłą w warunkach badania.

⁽³⁾ Urządzenie należy stosować i kalibrować w regularnych odstępach czasu zgodnie z instrukcją producenta. W przypadku zastosowania ciśnieniomierza o zalecanej jakości, np. wyposażonego w stalową membranę, nie jest potrzebna żadna kalibracja w laboratorium. Dokładność kalibracji można sprawdzić w laboratorium za pomocą jednopunktowego pomiaru pod ciśnieniem $1 \times 10^5\text{ Pa}$ w oparciu o ciśnieniomierz z odczytem mechanicznym. Jeżeli ciśnienie w tym punkcie zostanie zmierzone poprawnie, liniowość również pozostanie niezmienną. Jeżeli stosuje się inne urządzenia pomiarowe (bez kalibracji certyfikowanej przez producenta), kalibrację zaleca się przeprowadzać w całkowitym zakresie w regularnych odstępach czasu.

Uwaga – Odczyty ciśnienia stosuje się bezpośrednio do obliczenia ilości węgla wytworzonego w fazie gazowej (pkt 42–44). Ewentualnie można przeliczyć odczyty ciśnienia na objętości (w temperaturze 35 °C i ciśnieniu atmosferycznym) wytworzonego gazu z wykorzystaniem krzywej konwersji. Krzywą tę konstruuje się z danych uzyskanych przez wstrzykiwanie znanych objętości azotu do szeregu naczyń badawczych (np. butelek do surowicy) w temperaturze 35 ° ± 2° i zapisywanie otrzymanych odczytów ustabilizowanego ciśnienia (zob. dodatek 2). Obliczenia te zostały przedstawione w uwadze w pkt 44.

Uwaga – Należy unikać skaleczeń igłą podczas używania mikrostrzykawek.

- d. Analizator węglowy nadający się do bezpośredniego oznaczania węgla nieorganicznego w zakresie od 1 mg/l do 200 mg/l;
- e. Strzykawki o dużej precyzji do pobierania próbek gazowych i ciekłych;
- f. Mieszadła magnetyczne i krzywki (nieobowiązkowe);
- g. Komora rękawicowa (zalecana).

Odczynniki

14. W całym badaniu należy stosować odczynniki do analiz.

Woda

15. Woda destylowana lub dejonizowana (odtleniona przez barbotaż azotem zawierającym mniej niż 5 µl/l tlenu), zawierająca mniej niż 2 mg/l rozpuszczonego węgla organicznego.

Środowisko badania

16. Należy przygotować czynnik rozcieńczający, zawierający następujące składniki w podanych ilościach;

Bezwodny diwodoroortofosforan potasu (KH_2PO_4)	0,27
Dwunastowodny wodorofosforan sodu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1,12
Chlorek amonu (NH_4Cl)	0,53
Dwuwodny chlorek wapnia ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,075 g
Sześciowodny chlorek magnezu ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,10
Czterowodny chlorek żelaza(III) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,02
Resazuryna (wskaźnik tlenu)	0,001 g
Dziewięciowodny siarczek sodu ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	0,10
Roztwór podstawowy pierwiastków śladowych (nieobowiązkowy, pkt 18)	10 ml
Dodać odtlenioną wodę (pkt 15)	do 1 litra

Uwaga: aby zapewnić wystarczającą zdolność redukowania, należy stosować siarczek sodu, który jest świeżo dostarczony lub wypłukany i osuszony przed zastosowaniem. Badanie można prowadzić bez stosowania komory rękawicowej (zob. pkt 26). W tym przypadku końcowe stężenie siarczku sodu w środowisku należy zwiększyć do 0,20 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ na litr. Siarczek sodu można też dodać z odpowiedniego beztlenowego roztworu podstawowego przez korki zamkniętych naczyń badawczych, ponieważ taka procedura zmniejsza ryzyko utleniania. Siarczek sodu można zastąpić cytrynianem tytanu(III), który dodaje się przez korki zamkniętych naczyń badawczych w końcowym stężeniu 0,8–1,0 mmol/l. Cytrynian tytanu(III) stanowi wysoce skuteczny środek redukujący o niskiej toksyczności, który przygotowuje się w następujący sposób: rozpuścić

2,94 g dwuwodnego cytrynianu trisodowego w 50 ml odtlenionej wody (uzyskując roztwór 200 mmol/l) i dodać 5 ml 15 % (m/v) roztworu chlorku tytanu(III). Zneutralizować do pH $7 \pm 0,2$ za pomocą mineralnych zasad i wlać do odpowiedniego naczynia w strumieniu azotu. Stężenie cytrynianu tytanu(III) w tym roztworze podstawowym wynosi 164 mmol/l.

17. Wymieszać składniki środowiska badania, z wyjątkiem środka redukującego (siarczku sodu, cytrynianu tytanu) i przez 20 minut tuż przed zastosowaniem przepuszczać przez roztwór azotu, aby usunąć tlen. Następnie należy dodać właściwą objętość świeżo przygotowanego roztworu środka redukującego (przygotowanego w odtlenionej wodzie) tuż przed zastosowaniem środowiska badawczego. W razie potrzeby skorygować pH środowiska, używając w tym celu rozcieńczonego kwasu mineralnego lub rozcieńczonej zasady mineralnej do $7 \pm 0,2$.

Roztwór podstawowy pierwiastków śladowych (nieobowiązkowy)

18. Zaleca się, aby środowisko badania zawierało następujące pierwiastki śladowe w celu poprawienia przebiegu procesów degradacji beztlenowej, w szczególności jeżeli stosuje się niskie stężenia inokulum (np. 1 g/l) (11).

Czterowodny chlorek manganu ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	50 mg
Kwas borowy (H_3BO_3)	5 mg
Chlorek cynku (ZnCl_2)	5 mg
Chlorek miedzi(II) (CuCl_2)	3 mg
Dwuwodny molibdenian sodu (II) ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 mg
Sześciowodny chlorek kobaltu ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	100 mg
Sześciowodny chlorek niklu ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	10 mg
Selenian disodu (Na_2SeO_3)	5 mg
Dodać odtlenioną wodę (pkt 15)	do 1 litra

Badana substancja

19. Badaną substancję należy dodać jako roztwór podstawowy, zawiesinę, emulsję lub bezpośrednio w postaci stałej lub ciekłej, lub wchłoniętej na filtrze z włókna szklanego, aby wytworzyć stężenie węgla organicznego nie większe niż 100 mg/l. W przypadku użycia roztworów podstawowych, przygotować odpowiedni roztwór w wodzie (pkt 15) (uprzednio odtlenioną za pomocą barbotażu azotem) o takim stężeniu, aby dodana objętość wynosiła mniej niż 5 % całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej. W razie potrzeby skorygować pH roztworu podstawowego do $7 \pm 0,2$. W odniesieniu do badanych substancji, które są niewystarczająco rozpuszczalne w wodzie, zob. norma ISO 10634 (13). W przypadku zastosowania rozpuszczalnika należy przygotować dodatkową próbę kontrolną, w której rozpuszczalnik dodaje się tylko do zaszczipionego środowiska. Należy unikać rozpuszczalników organicznych, o których wiadomo, że hamują wytwarzanie metanu (takich jak chloroform i tetrachlorek węgla).

Uwaga – Zachować ostrożność w przypadku badanych substancji, które są toksyczne, lub których właściwości nie są znane.

Substancje odniesienia

20. Substancje odniesienia, takie jak benzoesan sodu, fenol i glikol polietylenowy 400, zostały zastosowane z powodzeniem w celu sprawdzenia procedury i uległy degradacji w ponad 60 % w ciągu 60 dni. Przygotować roztwór podstawowy (w odtlenionej wodzie) wybranej substancji odniesienia w taki sam sposób jak w przypadku substancji badanej i w razie potrzeby skorygować pH do $7 \pm 0,2$.

Próba kontrolna z hamowaniem (warunkowa)

21. Aby uzyskać informacje na temat toksyczności badanej substancji dla mikroorganizmów beztlenowych w celu ustalenia najbardziej odpowiedniego badanego stężenia, do naczynia zawierającego środowisko badania należy dodać badaną substancję i substancję odniesienia (zob. pkt 16), przy czym każda z nich ma mieć takie samo stężenie przy dodawaniu (zob. pkt 19 i 20 oraz norma ISO 13641-1 (12)).

Przefermentowany osad

22. Przefermentowany osad należy pobrać z komory fermentacyjnej oczyszczalni ścieków, w której oczyszczane są głównie ścieki domowe. Należy w pełni scharakteryzować osad i zamieścić podstawowe informacje w sprawozdaniu (zob. pkt 54). Jeżeli przewiduje się zastosowanie zaadaptowanego inokulum, można brać pod uwagę wykorzystanie przefermentowanego osadu z oczyszczalni ścieków przemysłowych. Do pobierania przefermentowanego osadu używać butelek z szeroką szyjką, wykonanych z polietylenu o dużej gęstości lub podobnego materiału, który może się rozszerzać. Napełnić butelki osadem do wysokości około 1 cm od wylotu butelek i szczelnie zamknąć, najlepiej używając do tego celu zaworu bezpieczeństwa. Po przewiezieniu do laboratorium zebrany osad można użyć bezpośrednio lub umieścić w laboratoryjnej komorze fermentacyjnej. Uwolnić nadmiar biogazu, ostrożnie otwierając butle z osadem. Jako źródło inokulum można ewentualnie zastosować osad beztlenowy wytworzony w laboratorium, jednak jego zakres działania może ulec pogorszeniu.

Uwaga – Przefermentowany osad wytwarza łatwopalne gazy, które stwarzają ryzyko pożaru i wybuchu: zawiera również potencjalnie patogenne organizmy, dlatego mając do czynienia z osadem należy zachować właściwe środki ostrożności. Ze względów bezpieczeństwa do pobierania osadu nie stosować szklanych naczyń.

23. Aby ograniczyć wytwarzanie gazu w tle i zmniejszyć wpływ ślepych prób kontrolnych, można rozważyć wstępne fermentowanie osadu. Jeżeli wymagana jest wstępna fermentacja, należy osad fermentować w temperaturze $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez okres do 7 dni, nie dodając do niego żadnych składników odżywczych ani substratów. Ustalono, że wstępna fermentacja prowadzona przez około 5 dni zwykle prowadzi do optymalnego zmniejszenia wytwarzania gazu w ślepej próbie bez niedopuszczalnego zwiększania okresów zwłoki lub inkubacji podczas fazy badania lub utraty działania w stosunku do niewielkiej liczby badanych substancji.
24. W przypadku badanych substancji, które są, lub co do których oczekuje się, że są słabo biodegradowalne, należy uwzględnić wstępne narażenie osadu na działanie badanej substancji w celu otrzymania lepiej dostosowanego inokulum. W takim przypadku należy dodać badaną substancję w stężeniu odpowiadającym stężeniu węgla organicznego na poziomie 5 mg/l–20 mg/l do przefermentowanego osadu i inkubować przez okres do 2 tygodni. Osad wstępnie narażony na działanie badanej substancji należy dokładnie opłukać przed użyciem (zob. pkt 25) i podać w sprawozdaniu z badania warunki wstępnego narażenia.

Inokulum

25. Opłukać osad (zob. pkt 22–24) tuż przed użyciem, aby obniżyć stężenie węgla nieorganicznego w końcowej zawieszynie do poziomu poniżej 10 mg/l. Odwirować osad w szczelnie zamkniętych probówkach (np. 3 000 g przez 5 min) i zlać supernatant. Otrzymany osad zawiesić w odtlenionym środowisku (pkt 16 i 17), ponownie odwirować zawieszynę i zlać supernatant. Jeżeli zawartość węgla nieorganicznego nie została wystarczająco obniżona, procedurę płukania osadu można powtórzyć maksymalnie dwa razy. Wydaje się, że nie ma to niekorzystnego wpływu na mikroorganizmy. Na koniec należy zawiesić osad w wymaganej objętości środowiska badania i oznaczyć zawieszynę ogólną [np. ISO 11923 (15)]. Końcowe stężenie zawieszyny ogólnej w naczyniach badawczych powinno mieścić się w zakresie 1 g/l–3 g/l (lub około 10 % tej wartości w nierozcieńczonym przefermentowanym osadzie). Powyższe operacje prowadzić w taki sposób, aby kontakt osadu z tlenem był minimalny (np. w atmosferze azotu).

PROCEDURA BADANIA

26. Wykonać następujące wstępne procedury z zastosowaniem technik mających na celu utrzymanie kontaktu między przefermentowanym osadem i tlenem na możliwie najniższym poziomie; może na przykład zająć konieczność pracy w komorze rękawicowej w atmosferze azotu lub oczyszczania butli azotem (4).

Przygotowanie prób badanych i prób kontrolnych

27. Przygotować co najmniej trzy egzemplarze naczyń badawczych (zob. pkt 13 b) na badaną substancję, ślepe próby kontrolne, substancje odniesienia, próby kontrolne z hamowaniem (warunkowe) i komory kontroli ciśnienia (procedura nieobowiązkowa) (zob. pkt 7, 19 i 21). Można również przygotować dodatkowe naczynia w celu oceny pierwotnej biodegradacji z zastosowaniem szczegółowych analiz badanej substancji. Można wykorzystać ten sam zestaw ślepych prób kontrolnych dla kilku badanych substancji w tym samym badaniu, pod warunkiem że objętości fazy gazowej są stałe.

28. Przygotować rozcieńczone inokulum przed dodaniem go do naczyń, np. za pomocą pipety z szerokim wylotem. Dodać podwielokrotności dobrze wymieszanego inokulum (pkt 25), tak aby stężenie zawiesiny ogólnej było takie samo we wszystkich naczyniach (między 1 g/l i 3 g/l). W razie potrzeby dodać roztwory podstawowe do substancji badanej i substancji odniesienia po skorygowaniu pH do $7 \pm 0,2$. Badaną substancję i substancję odniesienia należy dodać przy użyciu najbardziej odpowiedniej drogi wprowadzania (pkt 19).
29. Badane stężenie węgla organicznego powinno normalnie wynosić 20–100 mg/l (pkt 4). Jeżeli badana substancja jest toksyczna, badane stężenie należy obniżyć do 20 mg C/l, a nawet niższego poziomu, jeżeli ma być mierzona tylko pierwotna biodegradacja za pomocą szczegółowych analiz. Należy zauważyć, że zmienność wyników badania zwiększa się przy niższych badanych stężeniach.
30. W przypadku naczyń ze ślepych próbkami zamiast roztworu podstawowego zawiesiny lub emulsji należy dodać równoważną ilość nośnika stosowanego do dawkowania badanej substancji. Jeżeli badaną substancję wprowadzono wykorzystując filtry z włókna szklanego lub rozpuszczalniki organiczne, do ślepych prób należy dodać filtr lub równoważną objętość rozpuszczalnika, która została odparowana. Przygotować dodatkową kontrolną próbkę z badaną substancją w celu zmierzenia wartości pH. W razie potrzeby skorygować pH środowiska do $7 \pm 0,2$, używając rozcieńczonego kwasu mineralnego lub rozcieńczonej zasady mineralnej. Do wszystkich naczyń badawczych należy dodać takie same ilości substancji neutralizujących. Dodatki te nie powinny być konieczne, ponieważ wartości pH roztworów podstawowych badanej substancji i substancji odniesienia zostały już skorygowane (zob. pkt 19 i 20). Aby zmierzyć pierwotną biodegradację, należy pobrać właściwą próbkę z naczynia do kontroli pH lub z dodatkowego naczynia badawczego, a stężenie badanej substancji należy zmierzyć, stosując szczegółowe analizy. Jeżeli mieszaniny reakcyjne mają zostać wymieszane (nieobowiązkowo), do wszystkich naczyń można dodać powlekane magnesy.
31. Upewnić się, czy całkowita objętość cieczy V_1 i objętość fazy gazowej V_h były takie same we wszystkich naczyniach; należy również zanotować i zapisać wartości V_1 i V_h . Każde naczynie należy zamknąć gazoszczelnym korkiem i przenieść z komory rękawicowej (zob. pkt 26) do inkubatora (zob. pkt 13-a).

Nierozpuszczalne substancje badane

32. Dodać odważone ilości substancji, które słabo rozpuszczają się w wodzie, bezpośrednio do przygotowanych naczyń. Jeżeli niezbędne jest zastosowanie rozpuszczalnika (zob. pkt 19), przenieść roztwór badanej substancji lub zawiesinę do pustych naczyń. W miarę możliwości odparować rozpuszczalnik, przepuszczając przez naczynia azot, a następnie dodając inne składniki, mianowicie rozcieńczony osad (pkt 25) i odtlenioną wodę, jeśli zajdzie potrzeba. Należy również przygotować dodatkową próbkę kontrolną z rozpuszczalnikiem (zob. pkt 19). W odniesieniu do innych metod dodawania nierozpuszczalnych substancji, zob. norma ISO 10634 (13). Płynne substancje badane można dawkować za pomocą strzykawki do całkowicie przygotowanych szczelnie zamkniętych naczyń, jeżeli przewiduje się, że początkowe pH nie przekroczy 7 ± 1 , w przeciwnym razie należy dawkować je zgodnie z powyższym opisem (zob. pkt 19).

Inkubacja i pomiary ciśnienia gazu

33. Przygotowane naczynia należy inkubować w temperaturze $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ przez około 1 h, aby je ustabilizować i uwolnić nadmiar gazu do atmosfery, na przykład potrząsając każdym naczyniem po kolei, wprowadzając igłę miernika ciśnienia (pkt 13-c) przez korek i otwierając zawór do momentu, gdy ciśnieniomierz wskaże zero. Jeżeli na tym etapie lub podczas dokonywania pomiarów pośrednich ciśnienie fazy gazowej jest niższe od atmosferycznego, należy wprowadzić azot w celu przywrócenia ciśnienia atmosferycznego. Zamknąć zawór (zob. pkt 13-c) i kontynuować inkubację bez dostępu światła, upewniając się, czy wszystkie części naczyń są utrzymywane w temperaturze fermentacji. Po inkubacji obserwować wszystkie naczynia przez 24–48 h. Odrzucić naczynia, których zawartość cechuje się wyraźnie różowym zabarwieniem supernatantu, tj. jeżeli resazuryna (zob. pkt 16) zmieniła kolor, wskazując na obecność tlenu (zob. pkt 50). Chociaż małe ilości tlenu mogą być tolerowane przez układ, wyższe stężenia mogą w znacznym stopniu uniemożliwić przebieg biodegradacji beztlenowej. Można zaakceptować sporadyczne odrzucenie pojedynczego naczynia z zestawu trzech naczyń, ale wystąpienie większej liczby nieprawidłowości musi pociągnąć za sobą zbadanie procedur doświadczalnych oraz powtórzeniem badania.

34. Ostrożnie wymieszać zawartość każdego z naczyń, mieszając lub wstrząsając przez kilka minut co najmniej 2 lub 3 razy w tygodniu oraz na krótko przed każdym pomiarem ciśnienia. Wstrząsanie prowadzi do ponownego uformowania się zawiesiny inokulum i zapewnia równowagę gazową. Wszystkie pomiary ciśnienia należy wykonywać szybko, ponieważ temperatura naczyń badawczych może ulec obniżeniu, co spowoduje fałszywe odczyty. Podczas pomiaru ciśnienia całe naczynie badawcze, w tym fazę gazową, należy utrzymywać w temperaturze fermentacji. Zmierzyć ciśnienie gazu, na przykład przekłuwając korek igłą strzykawki (pkt 13-c) połączoną z urządzeniem mierzącym ciśnienie. Należy zadbać, aby do igły strzykawki nie dostała się woda; w takim przypadku należy wysuszyć mokre części i podłączyć nową igłę. Ciśnienie należy mierzyć w milibarach (zob. pkt 42). Ciśnienie gazu w naczyniach można mierzyć okresowo, np. co tydzień, i ewentualnie wypuszczać nadmiar gazu do atmosfery. Ewentualnie ciśnienie mierzy się tylko na końcu badania w celu określenia ilości wyprodukowanego biogazu.
35. Zaleca się wykonywanie pośrednich odczytów ciśnienia gazu, ponieważ wzrost ciśnienia stanowi wskazówkę co do możliwego terminu zakończenia badania i umożliwia śledzenie kinetyki (zob. pkt 6).
36. Zazwyczaj zakończenie badania następuje po okresie inkubacji wynoszącym 60 dni, chyba że krzywa biodegradacji uzyskana w wyniku pomiarów ciśnienia wcześniej osiągnęła stan równowagi, czyli stan, w którym osiągnięto maksymalny rozkład, a krzywa biodegradacji ma poziomy przebieg. Jeżeli wartość stanu równowagi wynosi mniej niż 60 %, interpretacja jest problematyczna, ponieważ wskazuje to, że tylko część cząsteczki została zmineralizowana lub że popełniony został błąd. Jeżeli pod koniec zwykłego okresu inkubacji wytwarzany jest gaz, ale stan równowagi nie został najwyraźniej osiągnięty, wówczas należy rozważyć przedłużenie badania w celu sprawdzenia, czy stan równowagi (> 60 %) zostanie osiągnięty.

Pomiar węgla nieorganicznego

37. Na końcu badania po ostatnim pomiarze ciśnienia gazu pozostawić osad do ustania. Otworzyć po kolei każde naczynie i natychmiast pobrać próbkę w celu określenia stężenia (mg/l) węgla nieorganicznego w supernatancie. Supernatantu nie należy odwirowywać ani filtrować, ponieważ spowodowałoby to niedopuszczalną stratę rozpuszczonego dwutlenku węgla. Jeżeli nie można wykonać analizy próbki płynu przy pobieraniu, należy umieścić ją w szczelnie zamkniętej fiolce, nie pozostawiając nad płynem wolnej przestrzeni na fazę gazową, schłodzonej do temperatury 4 °C, i przechowywać maksymalnie przez 2 dni. Po wykonaniu pomiaru węgla nieorganicznego zmierzyć i zanotować wartość pH.
38. Ewentualnie węgiel nieorganiczny w supernatancie można oznaczyć pośrednio, uwalniając rozpuszczony węgiel nieorganiczny jako dwutlenek węgla, który można zmierzyć w fazie gazowej. Po ostatnim pomiarze ciśnienia gazu wyrównać ciśnienie w każdym naczyniu badawczym do ciśnienia atmosferycznego. Zakwasić zawartość każdego z naczyń do około pH 1 dodając stężonego kwasu mineralnego (np. H_2SO_4) przez korek każdego szczelnie zamkniętego naczynia. Inkubować wstrząśnięte naczynia w temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ przez około 24 godziny i mierzyć ciśnienie wydzielonego dwutlenku węgla za pomocą ciśnieniomierza.
39. Dokonać podobnych odczytów w przypadku ślepych prób, substancji odniesienia oraz, jeśli zostały zastosowane, naczyni z próbami kontrolnymi z hamowaniem (zob. pkt 21).
40. W niektórych przypadkach, zwłaszcza jeżeli te same naczynia z próbami kontrolnymi stosowane są w odniesieniu do kilku badanych substancji, w razie potrzeby należy rozważyć pomiary pośrednich stężeń węgla nieorganicznego w naczyniach badawczych i naczyniach z próbami kontrolnymi. W takim przypadku na potrzeby wszystkich pośrednich pomiarów należy przygotować wystarczającą liczbę naczyń. Zaleca się raczej takie postępowanie zamiast pobierania wszystkich próbek tylko z jednego naczynia. To ostatnie można stosować tylko wtedy, jeśli nie uzna się wymaganej objętości do analizy rozpuszczonego węgla nieorganicznego za zbyt dużą. Pomiar rozpuszczonego węgla nieorganicznego należy wykonać po zmierzeniu ciśnienia gazu bez uwalniania nadmiaru gazu jak opisano poniżej:
- pobrać jak najmniejszą objętość próbek supernatantu za pomocą strzykawki przez korek bez otwierania naczynia i oznaczyć węgiel nieorganiczny w próbce;
 - po pobraniu próbki nadmiar gazu zostaje uwolniony lub nie;

- należy zauważyć, że nawet niewielkie zmniejszenie objętości supernatantu (np. około 1 %) może spowodować znaczny wzrost objętości gazu (V_h) w fazie gazowej;
- równania (zob. pkt 44) koryguje się w razie potrzeby zwiększając V_h w równaniu 3.

Szczegółowe analizy

41. Jeżeli ma zostać oznaczona pierwotna beztlenowa degradacja (zob. pkt 30), w celu przeprowadzenia szczegółowej analizy pobrać odpowiednią objętość próbki na początku i na końcu badania z naczyń zawierających badaną substancję. Po pobraniu należy pamiętać, że objętości fazy gazowej nad roztworem (V_h) i cieczy (V_l) ulegną zmianie, i uwzględnić ten fakt podczas obliczania wyników wytwarzania gazu. Ewentualnie próbki do celów szczegółowych analiz można pobrać z dodatkowych mieszanin sporządzonych wcześniej w tym celu (pkt 30).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

42. Z praktycznych względów ciśnienie gazu mierzy się w milibarach ($1 \text{ mbar} = 2 \times 10^2 \text{ Pa} = 10 \text{ Pa}$; $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$), objętość w litrach, a temperaturę w stopniach Celsjusza.

Węgiel w fazie gazowej

43. Ponieważ zarówno 1 mol metanu, jak i 1 mol dwutlenku węgla zawiera 12 g węgla, masa węgla w danej objętości wydzielonego gazu może być wyrażona jako:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Równanie [1]}$$

gdzie:

m = masa węgla (mg) w danej objętości wydzielonego gazu;

12 = względna masa atomowa węgla;

n = liczba moli gazu w danej objętości.

Jeżeli wytworzony został w znacznych ilościach gaz inny niż metan lub dwutlenek węgla (np. N_2O), należy dostosować wzór [1] w celu uwzględnienia ewentualnych skutków wywołanych przez wytworzone gazy.

44. Na podstawie praw gazowych n można opisać jako:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Równanie [2]}$$

gdzie:

p = ciśnienie gazu (w paskalach);

V = objętość gazu (m^3);

R = stała molowa gazu [$8,314 \text{ J/(mol K)}$];

T = temperatura inkubacji (w kelwinach).

W wyniku połączenia równań [1] i [2] oraz wykasowania niewymierności, aby uwzględnić wytwarzania gazu w ślepej próbie kontrolnej:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Równanie [3]}$$

gdzie:

m_h = masa węgla netto wytworzonego jako gaz w fazie gazowej (mg);

Δp = średnia różnica między początkowym i końcowym ciśnieniem w naczyniach badawczych minus odpowiadająca im średnia w naczyniach ze ślepą próbą (milibary);

V_h = objętość fazy gazowej w naczyniu (l);

0,1 = zamiana newtonów/ m^2 na milibary, a m^3 na litry.

Równanie [4] należy stosować w normalnej temperaturze inkubacji 35 °C (308 K):

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Równanie [4]}$$

Uwaga: alternatywna metoda obliczenia objętości. Odczyty ciśnieniomierza są przeliczane na ml wytworzonego gazu ze standardowej krzywej utworzonej w wyniku wykreślenia zależności wstrzykniętej objętości (ml) od odczytu ciśnieniomierza (dodatek 2). Liczbę moli (n) gazu w fazie gazowej w każdym naczyniu oblicza się, dzieląc sumaryczną produkcję gazu (ml) przez 25 286 ml/mol, co stanowi objętość zajmowaną przez jeden mol gazu w temperaturze 35 °C i przy standardowym ciśnieniu atmosferycznym. Ponieważ zarówno 1 mol CH_4 , jak i 1 mol O_2 zawiera 12 g węgla, masa węgla (mg) w fazie gazowej (m_h) jest wyrażona Równaniem [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Równanie [5]}$$

Wykasowanie niewymierności w celu uwzględnienia wytwarzania gazu w ślepej próbie:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475 \Delta V \quad \text{Równanie [6]}$$

gdzie:

m_h = masa węgla netto wytworzonego jako gaz w fazie gazowej (mg);

DV = średnia różnica między objętością gazu wytworzonego w fazie gazowej w naczyniach badawczych oraz w naczyniach ślepej próby;

25 286 = objętość zajmowana przez 1 mol gazu w temperaturze 35 °C, 1 atmosfera fizyczna.

45. W razie potrzeby przebieg biodegradacji można śledzić wykreślając skumulowany wzrost ciśnienia Δp (w milibarach) w funkcji czasu. Na podstawie tej krzywej można określić i zanotować fazę zwłoki (w dniach). Faza zwłoki jest to okres od rozpoczęcia badania do momentu rozpoczęcia znacznej degradacji (zob. np. dodatek 3). W przypadku pobrania i poddania analizie pośrednich próbek supernatantu (zob. pkt 40, 46 i 47) można uzyskać wykres całkowitego wytworzonego węgla (w gazie i w cieczy) zamiast samego sumarycznego ciśnienia.

Węgiel w cieczy

46. Nie uwzględnia się ilości metanu w cieczy, ponieważ jego rozpuszczalność w wodzie jest bardzo niska. Masę węgla nieorganicznego w cieczy w naczyniach badawczych oblicza się z równania [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Równanie [7]}$$

gdzie:

m_l = masa węgla nieorganicznego w cieczy (mg);

C_{net} = stężenie węgla nieorganicznego w naczyniach badawczych minus stężenie węgla nieorganicznego w naczyniach z próbą kontrolną na koniec badania (mg/l);

V_l = objętość cieczy w naczyniu (l).

Całkowity węgiel zgazowany

47. Obliczyć całkowitą masę zgazowanego węgla w naczyniu, wykorzystując równanie [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Równanie [8]}$$

gdzie:

m_t = całkowita masa zgazowanego węgla (mg);

m_h and m_l zdefiniowane powyżej.

Węgiel w badanej substancji

48. Obliczyć masę węgla w naczyniach badawczych pochodzącego z dodanej substancji badanej z równania [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Równanie [9]}$$

gdzie:

m_v = masa węgla w badanej substancji (mg);

C_c = stężenie węgla w badanej substancji w naczyniu badawczym (mg/l)

V_l = objętość cieczy w naczyniu badawczym (l).

Zakres biodegradacji

49. Obliczyć procentową wartość biodegradacji w fazie gazowej, stosując równanie [10], i całkowitą procentową wartość biodegradacji, stosując równanie [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad \text{Równanie [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad \text{Równanie [11]}$$

gdzie:

D_h = biodegradacja w fazie gazowej (%);

D_t = całkowita biodegradacja (%);

m_h , m_v and m_t zdefiniowane powyżej.

Stopień pierwotnej biodegradacji oblicza się na podstawie (nieobowiązkowych) pomiarów stężenia badanej substancji na początku i na końcu inkubacji z równania [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \quad \text{Równanie [12]}$$

gdzie:

D_p = pierwotna degradacja badanej substancji (%);

S_i = początkowe stężenie badanej substancji (mg/l);

S_e = końcowe stężenie badanej substancji (mg/l).

Jeżeli metoda analizy wykaże znaczne stężenia badanej substancji w nieskorygowanym, beztlenowym osadzie inokulum, stosuje się równanie [13]:

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

gdzie:

D_p^1 = skorygowana pierwotna degradacja badanej substancji (%);

S_{ib} = początkowe »widoczne« stężenie badanej substancji w ślepych próbach kontrolnych (mg/l);

S_{eb} = końcowe »widoczne« stężenie badanej substancji w ślepych próbach kontrolnych (mg/l).

Ważność wyników

50. Należy wykorzystać jedynie odczyty ciśnienia z naczyń nie wykazujących różowego zabarwienia (zob. pkt 33). Zanieczyszczenie tlenem można zminimalizować, wykorzystując odpowiednie techniki postępowania z próbkami beztlenowymi.
51. Badanie należy uznać za ważne, jeżeli substancja odniesienia osiągnie stan równowagi, odpowiadający ponad 60 % biodegradacji ⁽¹⁾.
52. Jeżeli na koniec badania pH przekroczyło zakres 7 ± 1 i nie doszło do wystarczającej biodegradacji, powtórzyć badanie ze zwiększoną pojemnością buforową środowiska.

⁽¹⁾ Należy poddać to ponownej ocenie w przypadku uwzględnienia adsorpcyjnych i nierozpuszczalnych substancji chemicznych odniesienia.

Hamowanie degradacji

53. Zarówno w naczyniach zawierających badaną substancję, jak i w naczyniach z substancją odniesienia ilość wytwarzanego gazu powinna być co najmniej taka sama jak w naczyniach zawierających tylko substancję odniesienia; przeciwna sytuacja wskazuje na hamowanie wytwarzania gazu. W niektórych przypadkach wytwarzanie gazu w naczyniach zawierających badaną substancję bez substancji odniesienia będzie niższe niż w ślepych próbach kontrolnych, co wskazuje na hamujące działanie badanej substancji.

Sprawozdanie z badania

54. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja:

- nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna, numer CAS, wzór strukturalny i istotne właściwości fizykochemiczne;
- stopień czystości substancji badanej (zanieczyszczenia).

Warunki badania:

- objętość rozcieńczonej cieczy z komory fermentacyjnej (V_f) i fazy gazowej (V_h) w naczyniu;
- opis naczyń badawczych, główne cechy pomiaru biogazu (np. rodzaj ciśnieniomierza) i analizatora węgla nieorganicznego;
- dodanie badanej substancji i substancji odniesienia do układu badawczego: zastosowane badane stężenie i każdorazowe zastosowanie rozpuszczalników;
- szczegółowe informacje dotyczące zastosowanego inokulumu: nazwa oczyszczalni ścieków, opis źródła oczyszczonych ścieków (np. temperatura robocza, czas retencji osadu, głównie ścieki domowe itd.), stężenie, wszystkie informacje konieczne do uzasadnienia tych danych oraz informacje dotyczące wstępnego przygotowania inokulumu (np. wstępna fermentacja, wstępne narażenie);
- temperatura inkubacji;
- liczba kontrprób.

Wyniki:

- poziomy pH i węgla nieorganicznego na końcu badania;
- stężenie badanej substancji na początku i na końcu badania, jeżeli wykonano szczegółowy pomiar;
- w razie potrzeby wszystkie dane zmierzone w naczyniach badawczych, naczyniach ze ślepą próbą, naczyniach z substancją odniesienia, próbach kontrolnych z hamowaniem (np. ciśnienie w milibarach, stężenie węgla nieorganicznego (mg/l)) w formie tabeli (dane mierzone w fazie gazowej i w cieczy należy podawać osobno);
- statystyczna obróbka danych, czas trwania badania i wykres biodegradacji badanej substancji, substancji odniesienia i kontroli hamowania;
- procent biodegradacji badanej substancji i substancji odniesienia;
- uzasadnienie w przypadku ewentualnego odrzucenia wyników badania,
- omówienie wyników.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Następujące rozdziały niniejszego załącznika:

C.4 Oznaczanie szybkiej biodegradowalności;

C.9 Biodegradacja – test Zahn-Wellensa;

C.10 Symulacyjne badanie – w warunkach tlenowych w oczyszczalniach ścieków:

A: Zestawy osadu czynnego, B: Biofilmy

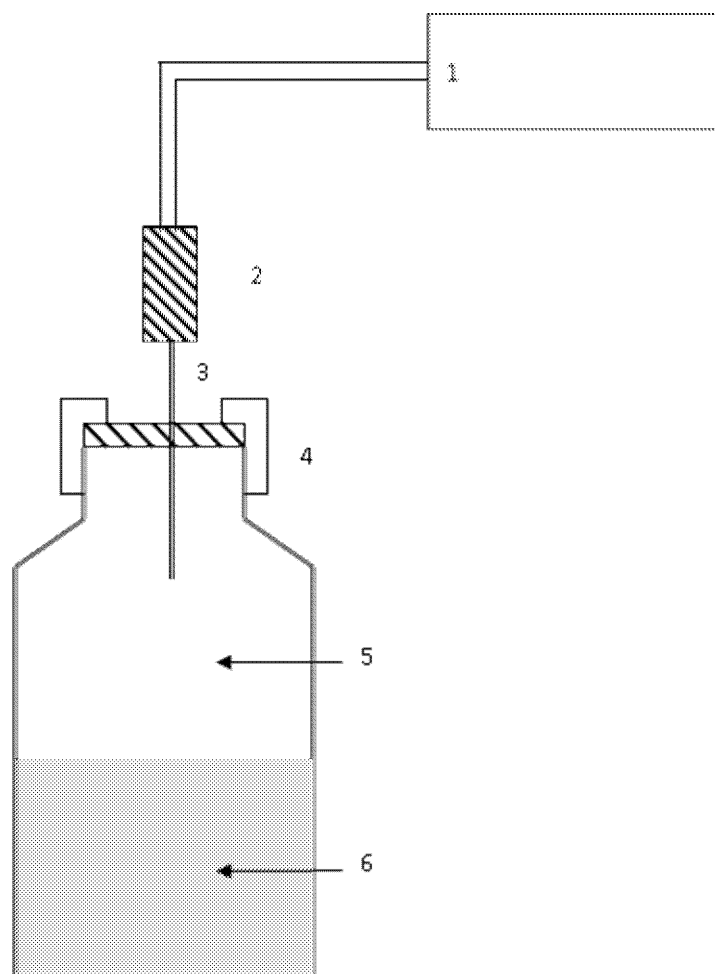
C.11, Biodegradacja – Zahamowanie oddychania osadu czynnego

- (2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), Wytuczna OECD w sprawie badania chemikaliów, No. 302C, OECD, Paryż

- (3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. i Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1 527–1 550. (opublikowane również jako sprawozdanie techniczne ECETOC nr 28 z czerwca 1988 r.).
 - (4) Shelton D.R. i Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, 47, 850-857.
 - (5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. i McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
 - (6) Healy, J.B.Jr. i 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. Dokument roboczy, projekt 2, nr 35.24, Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (ASTM), Filadelfia.
 - (8) Battersby, N.S. i 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, Filadelfia.
 - (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
 - (11) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (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) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.
 - (13) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (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. i Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
 - (15) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.
-

Dodatek 1

Przykład aparatury do mierzenia wytwarzania biogazu na podstawie ciśnienia gazu



Legenda:

- 1 – Ciśnieniomierz
- 2 – Gazoszczelny zawór 3-drogowy
- 3 – Igła do strzykawki
- 4 – Gazoszczelna uszczelka (obciskana nasadka i korek)
- 5 – Faza gazowa nad cieczą (V_h)
- 6 – Inokulum z przefermentowanego osadu (V_l)

Naczynia badawcze w środowisku o temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

Dodatek 2

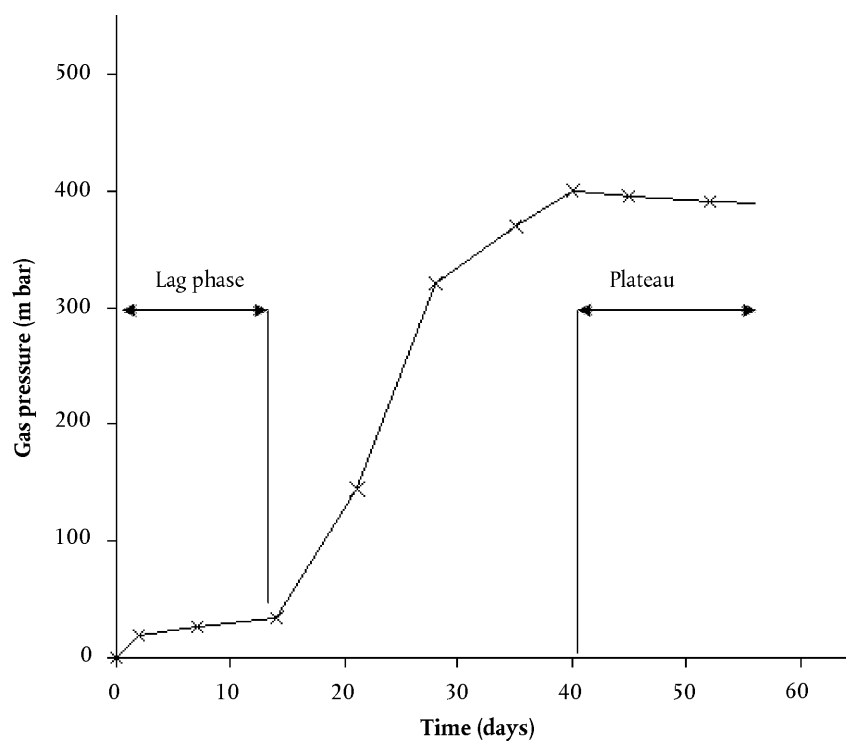
Przeliczanie odczytów ciśnieniomierza

Odczyty z ciśnieniomierza można powiązać z objętościami gazu, wykorzystując w tym celu krzywą standardową powstałą w wyniku wstrzykiwania znanych objętości powietrza w temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ do butelek na surowicę, zawierających objętość wody równą objętości mieszaniny reakcyjnej V_R :

- umieścić podwielokrotności V_R ml wody, utrzymywane w temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, w pięciu butelkach na surowicę. Butelki szczelnie zamknąć i pozostawić na godzinę w łaźni wodnej w temperaturze 35 °C do stabilizacji;
- włączyć ciśnieniomierz, poczekać aż się ustabilizuje, i ustawić wartość zerową;
- wprowadzić igłę strzykawki przez korek jednej z butelek, otworzyć zawór i odczekać, aż ciśnieniomierz wskaże zero, po czym zamknąć zawór;
- procedurę tę należy powtórzyć dla pozostałych butelek;
- do każdej butelki wstrzyknąć 1 ml powietrza o temperaturze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Wprowadzić igłę (na mierniku) przez korek jednej z butelek i poczekać, aż odczyt ciśnienia ustabilizuje się. Zanotować ciśnienie, otworzyć zawór i odczekać, aż miernik ciśnienia wskaże zero, po czym zamknąć zawór;
- powtórzyć procedurę dla butelek;
- powtórzyć całą powyższą procedurę z zastosowaniem 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml i 50 ml powietrza;
- wykreślić krzywą konwersji ciśnienia (Pa) w funkcji objętości wstrzykniętego gazu V_b (ml). Dane wskazane przez instrument mają charakter liniowy w zakresie 0 Pa–70 000 Pa oraz 0 ml–50 ml wytwarzanego gazu.

Dodatek 3

Przykład krzywej degradacji (sumaryczny wzrost ciśnienia netto)



Przykład karty charakterystyki badania biodegradacji beztlenowej – Karta charakterystyki badanej substancji

Laboratorium: Badana substancja: Badanie nr:
 Temperatura badania: (°C): Objętość fazy gazowej (V_h): (l) Objętość cieczy (V_l): (l)
 Węgiel w badanej substancji $C_{c,v}$: (mg/l) m_v ⁽¹⁾: (mg)

Dzień	p_1 (badanie) (mbar)	p_2 (badanie) (mbar)	p_3 (badanie) (mbar)	p (badanie) średnia (mbar)	p_4 (ślepa próba) (mbar)	p_5 (ślepa próba) (mbar)	p_6 (ślepa próba) (mbar)	p (ślepa próba) średnia (mbar)	p (netto) badanie – ślepa próba średnia (mbar)	Δp (netto) sumarycz- nie (mbar)	m_h faza ga- zowa C ⁽²⁾ (mg)	D_h Biodegrada- cja ⁽³⁾ (%)
	$C_{IC,1}$ badanie (mg)	$C_{IC,2}$ badanie (mg)	$C_{IC,3}$ badanie (mg)	C_{IC} średnia arytme- tyczna ba- dania (mg)	$C_{IC,4}$ ślepa próba (mg)	$C_{IC,5}$ ślepa próba (mg)	$C_{IC,6}$ ślepa próba (mg)	C_{IC} średnia arytme- tyczna śle- pej próby (mg)	$C_{IC,net}$ badanie – ślepa próba średnia (mg)	m_l C w cieczy ⁽⁴⁾ (mg)	m_l C ogółem ⁽⁵⁾ (mg)	D_l Biodegrada- cja ⁽⁶⁾ (%)
Węgiel nie- organiczny (koniec)												
pH (koniec)												

⁽¹⁾ Węgiel w naczyniu badawczym, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$

⁽²⁾ Węgiel w fazie gazowej, m_h w normalnej temperaturze inkubacji (35 °C): $m_h = 0,468 \times p \times V_h$

⁽³⁾ Biodegradacja obliczona na podstawie gazu w fazie gazowej, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

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

⁽⁵⁾ Całkowity węgiel zgazowany, m_t (mg): $m_t = m_l + m_h$

⁽⁶⁾ Całkowita biodegradacja, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

Laboratorium: Substancja odniesienia: Badanie nr:
 Temperatura badania: (°C): Objętość fazy gazowej (V_h): (l) Objętość cieczy (V_l) (l):
 Węgiel w substancji odniesienia $C_{c,v}$ (mg/l): m_v (¹) (mg):

Dzień	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) średnia (mbar)	p_4 (zaham.) (mbar)	p_5 (zaham.) (mbar)	p_6 (zaham.) (mbar)	p (zaham.) średnia (mbar)	p (ref.) ref. – ślepa próba (mbar)	Δp (ref.) sumarycz- nie (mbar)	m_h C (²) w fazie gazowej (mg)	D_h Biodegrada- cja (³) (%)
	$C_{IC, 1}$ ref. (mg)	$C_{IC, 2}$ ref. (mg)	$C_{IC, 3}$ ref. (mg)	C_{IC} średnia ref. (mg)	$C_{IC, 4}$ zaham. (mg)	$C_{IC, 5}$ zaham. (mg)	$C_{IC, 6}$ zaham. (mg)	C_{IC} średnie za- ham. (mg)	$C_{IC, net}$ ref. – za- ham. (mg)	m_l C w cieczy (⁴) (mg)	m_t C ogółem (⁵) (mg)	D_t Biodegrada- cja (⁶) (%)
Węgiel nie- organiczny (koniec)												
pH (koniec)												

(¹) Węgiel w naczyniu badawczym, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$

(²) Węgiel w fazie gazowej, m_h w normalnej temperaturze inkubacji (35 °C): $m_h = 0,468 \times p \times V_h$

(³) Biodegradacja obliczona na podstawie gazu w fazie gazowej, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

(⁴) Węgiel w cieczy, m_l (mg): $m_l = C_{IC, net} \times V_l$

(⁵) Całkowity węgiel zgazowany, m_t (mg): $m_t = m_l + m_h$

(⁶) Całkowita biodegradacja, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

C.44. WYMYWANIE W KOLUMNACH GLEBOWYCH**WPROWADZENIE**

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 312 (2004 r.) w sprawie badań. Sztuczne substancje chemiczne mogą docierać do gleby bezpośrednio w wyniku celowego wprowadzenia (np. agrochemikalia) lub drogami pośrednimi (np. przez ścieki → osady ściekowe → glebę lub powietrze → składowanie na mokro/sucho). Aby ocenić ryzyko związane z tymi substancjami chemicznymi, ważne jest oszacowanie ich potencjału w zakresie przemian w glebie oraz przemieszczania się (wmywania) do głębszych warstw gleby i ostatecznie do wód podziemnych.
2. Dostępnych jest kilka metod umożliwiających zmierzenie potencjału wmywania substancji chemicznych w glebie w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, tj. chromatografia cienkowarstwowa gleby, chromatografia grubowarstwowa gleby, chromatografia cieczowa gleby oraz pomiary adsorpcji/desorpcji (1)(2). W przypadku niezjonizowanych substancji chemicznych współczynnik podziału n-oktanol/woda (P_{ow}) umożliwia szybkie oszacowanie ich adsorpcji i potencjału wmywania (3)(4)(5).
3. Opisana tu metoda badawcza polega na chromatografii kolumnowej gleby o naruszonej strukturze (zob. definicja w dodatku 1). Przeprowadza się dwa rodzaje eksperymentów w celu oznaczenia (i) potencjału wmywania badanej substancji chemicznej, oraz (ii) potencjału wmywania produktów przemiany (badanie z zalegającymi pozostałościami) w glebach w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (⁽¹⁾). Metoda badawcza oparta jest na istniejących metodach (6)(7)(8)(9)(10)(11).
4. W trakcie warsztatów OECD na temat selekcji gleb/osadów zorganizowanych w Belgirate we Włoszech w 1995 r. (12), ustalono ilość i rodzaj gleb, które mają być stosowane na potrzeby tej metody badawczej. Opracowano również zalecenia dotyczące pobierania, obróbki i przechowywania próbek gleby w celu przeprowadzenia eksperymentów dotyczących wmywania.

ZASADA METODY BADANIA

5. Kolumny wykonane z odpowiedniego obojętnego materiału (np. szkła, stali nierdzewnej, aluminium, teflonu, polichlorku winylu itd.) wypełnia się glebą, a następnie nasycza ją i stabilizuje roztworem w formie »sztucznego deszczu« (zob. definicja w dodatku 1) i pozostawia do odsączenia. Następnie na powierzchnię gleby w każdej kolumnie wprowadza się badaną substancję chemiczną lub zalegające pozostałości badanej substancji chemicznej. Następnie kolumny glebowe nawadnia się sztucznym deszczem i zbiera odciek. Po zakończeniu procesu wmywania glebę wyjmuje się z kolumn i dzieli na odpowiednią liczbę segmentów, w zależności od informacji, które trzeba uzyskać na podstawie badania. Każdy segment gleby i odciek analizuje się następnie pod kątem badanej substancji chemicznej oraz, w stosownych przypadkach, pod kątem produktów przemiany lub innych substancji chemicznych będących przedmiotem zainteresowania.

STOSOWANIE METODY BADAWCZEJ

6. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych (nieoznakowanych lub oznakowanych izotopowo np. za pomocą ¹⁴C), w odniesieniu do których istnieje metoda analityczna o wystarczającej dokładności i czułości. Niniejszej metody badawczej nie należy stosować w przypadku substancji chemicznych, które ulatniają się z gleby lub wody i w związku z tym nie utrzymują się w glebie lub odcieku w eksperymentalnych warunkach niniejszej metody badawczej.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

7. Do pomiaru działania wmywającego w kolumnach glebowych wykorzystać można nieoznakowane lub oznakowane izotopowo badane substancje chemiczne. Materiał oznakowany izotopowo jest wymagany w przypadku badania wmywania produktów przemiany (zalegających pozostałości badanej substancji chemicznej) i oznaczania bilansu masy. Do oznakowania zaleca się stosowanie ¹⁴C, ale wykorzystać można również inne izotopy, takie jak ¹³C, ¹⁵N, ³H, ³²P. Na ile to możliwe, znacznik powinien być umieszczony w najbardziej stabilnych częściach cząsteczki. Czystość badanej substancji chemicznej powinna wynosić co najmniej 95 %.
8. Większość substancji chemicznych należy stosować jako substancje pojedyncze. W przypadku substancji czynnych zawartych w środkach ochrony roślin w celu zbadania wmywania macierzystej substancji badanej można jednak stosować postacie użytkowe, których zbadanie jest konieczne w szczególności wtedy, gdy mieszanina może wpłynąć na tempo uwalniania (np. postacie użytkowe granulowane lub o kontrolowanym uwalnianiu). Jeżeli chodzi o szczególne wymagania dotyczące projektu badania w odniesieniu do mieszanin, przed jego wykonaniem pomocna może okazać się konsultacja z organem regulacyjnym. W przypadku badań wmywania zalegających pozostałości, wykorzystać należy czystą macierzystą badaną substancję.

(¹) Badania wmywania w kolumnie z użyciem środków ochrony roślin mogą stanowić źródło informacji na temat mobilności badanej substancji chemicznej i produktów jej przemiany oraz mogą uzupełnić statyczne badania sorpcji.

9. Przed przystąpieniem do wykonania badań wymywania w kolumnach glebowych, należałoby uzyskać następujące dane na temat badanej substancji chemicznej:
- (1) rozpuszczalność w wodzie [metoda badawcza A.6] (13);
 - (2) rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych;
 - (3) prężność par [metoda badawcza A.4 (13) oraz] stała Henry'ego;
 - (4) współczynnik podziału n-oktanol/woda [metody badawcze A.8 i A.24] (13);
 - (5) współczynnik adsorpcji (K_d , K_f lub K_{oc}) [metody badawcze C.18 lub C.19] (13);
 - (6) hydroliza [metoda badawcza C.7] (13);
 - (7) stała dysocjacji (pK_a) [OECD TG 112] (25);
 - (8) tlenowa i beztlenowa przemiana w glebie [metoda badawcza C.23] (13).
- Uwaga:* temperaturę, w której pomiary te zostały wykonane, należy podać w odpowiednich sprawozdaniach z badania.
10. Ilość badanej substancji chemicznej wprowadzonej do kolumn glebowych powinna być wystarczająca, aby umożliwić wykrycie co najmniej 0,5 % zastosowanej dawki w każdym pojedynczym segmencie. W przypadku czynnych substancji chemicznych zawartych w środkach ochrony roślin ilość zastosowanych badanych substancji chemicznych może odpowiadać maksymalnej zalecanej dawce (pojedyncze zastosowanie).
11. Musi być dostępna odpowiednia metoda analityczna o znanej dokładności, precyzji i czułości do ilościowego oznaczania badanej substancji chemicznej oraz, w stosownych przypadkach, produktów jej przemiany w glebie i odcieku. Znana powinna być także analityczna granica wykrywalności badanej substancji chemicznej i jej istotnych produktów przemiany (zazwyczaj co najmniej wszystkich produktów przemiany ≥ 10 % zastosowanej dawki obserwowanej w badaniach dróg przemian, ale najlepiej wszystkich istotnych produktów przemiany) (zob. pkt 17).

CHEMICZNA SUBSTANCJA ODNIESIENIA

12. Chemiczne substancje odniesienia o znanym działaniu wymywającym, takie jak atrazyna lub monuron, które uznać można za substancje o średniej skłonności do wymywania w glebie, należy stosować w celu oceny względnego przemieszczania się badanej substancji chemicznej w glebie (1)(8)(11). W celu potwierdzenia hydrodynamicznych właściwości kolumny glebowej użyteczna może być również polarna chemiczna substancja odniesienia nie ulegająca sorpcji ani degradacji (np. tryt, bromek, fluoresceina, eozyna), umożliwiającą śledzenie przemieszczania się wody w kolumnie.
13. Wzorce analityczne również mogą być przydatne do określenia właściwości lub tożsamości produktów przemiany znajdujących się w segmentach gleby i odciekach przy wykorzystaniu chromatografii, spektroskopii lub innych odpowiednich metod.

DEFINICJE I JEDNOSTKI

14. Zob. dodatek 1.

KRYTERIA JAKOŚCI

Odzysk

15. Suma procentowych ilości badanej substancji chemicznej znajdujących się w segmentach gleby i w odcieku z kolumny po zakończeniu procesu wymywania stanowi odzysk z eksperymentu wymywania. Odzysk powinien mieścić się w zakresie 90–110 % w odniesieniu do substancji chemicznych oznakowanych izotopowo (11) i 70–110 % w odniesieniu do nieoznakowanych substancji chemicznych (8).

Powtarzalność i czułość metody analitycznej

16. Powtarzalność metody analitycznej mającej na celu ilościowe określenie badanej substancji chemicznej i produktów przemiany można sprawdzić, stosując podwójną analizę tego samego ekstraktu z segmentu gleby lub odcieku (zob. pkt 11).

17. Granica wykrywalności metody analitycznej w odniesieniu do badanej substancji chemicznej i produktów przemiany powinna wynosić co najmniej $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ w przypadku każdego segmentu gleby lub odcieku (jako badanej substancji chemicznej) lub 0,5 % ilości wprowadzonej do któregośkolwiek pojedynczego segmentu, w zależności od tego, która z tych wartości jest niższa. Należy określić granicę oznaczalności.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Układ badawczy

18. W badaniu wykorzystywane są kolumny do wymywania (podzielne lub niepodzielne) wykonane z odpowiedniego obojętnego materiału (np. szkła, stali nierdzewnej, aluminium, teflonu, polichlorku winylu itd.), których wewnętrzna średnica wynosi co najmniej 4 cm, a wysokość co najmniej 35 cm. Materiał, z którego są wykonane kolumny, należy zbadać pod kątem ewentualnych interakcji z badaną substancją chemiczną lub produktami jej przemiany. Przykłady odpowiednich podzielnych i niepodzielnych kolumn przedstawione zostały w dodatku 2
19. Do wypełniania kolumny i ubijania w nich gleby stosuje się łyżkę, tłok i urządzenie wibracyjne.
20. W celu nawilżenia kolumn glebowych sztucznym deszczem można zastosować tłok lub pompy perystaltyczne, sitka natryskowe, butle Mariotte'a lub zwykłe wkraplacze.

Wypożyczenie laboratoryjne i substancje chemiczne

21. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, w szczególności następujące urządzenia:
- (1) sprzęt laboratoryjny, taki jak aparatura do GLC, HPLC i TLC, włącznie z odpowiednimi systemami detekcyjnymi do analizy oznakowanych i nieoznakowanych substancji chemicznych lub odwróconą metodą rozcieńczeń izotopowych;
 - (2) przyrządy do celów identyfikacji (np. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itp.);
 - (3) scyntylator cieczowy dla badanych substancji chemicznych oznakowanych izotopowo;
 - (4) utleniacz do spalania oznakowanych materiałów
 - (5) aparatura do ekstrakcji (na przykład próbki wirówkowe do ekstrakcji na zimno i aparat ekstrakcyjny Soxhleta do ciągłej ekstrakcji z ogrzewaniem pod chłodnicą zwrotną);
 - (6) aparatura do zatężania roztworów i ekstraktów (np. wyparka rotacyjna),
22. Zastosowane substancje chemiczne obejmują: rozpuszczalniki organiczne do analizy, takie jak aceton, metanol itp.; ciecz scyntylacyjną; 0,01 roztwór M CaCl_2 w destylowanej lub dejonizowanej wodzie (= sztuczny deszcz).

Badana substancja chemiczna

23. Aby wprowadzić badaną substancję chemiczną do kolumny glebowej, należy rozpuścić ją w wodzie (dejonizowanej lub destylowanej). Jeżeli badana substancja chemiczna jest słabo rozpuszczalna w wodzie, można ją wprowadzić w postaci użytkowej produktu (w stosownych przypadkach po zawieszeniu lub emulgacji w wodzie) albo w dowolnym rozpuszczalniku organicznym. W przypadku zastosowania rozpuszczalnika organicznego należy ograniczyć jego ilość do minimum i odparować z powierzchni kolumny glebowej przed rozpoczęciem procedury wymywania. Postacie użytkowe w formie stałej, takie jak granulki, należy wprowadzać jako ciało stałe bez dodawania wody; aby umożliwić lepsze rozmieszczenie na powierzchni kolumny glebowej użytkowej postaci produktu, przed wprowadzeniem można go wymieszać z niewielką ilością piasku kwarcowego (np. 1 g).
24. Ilość badanej substancji chemicznej wprowadzonej do kolumn glebowych powinna być wystarczająca, aby umożliwić wykrycie co najmniej 0,5 % zastosowanej dawki w każdym pojedynczym segmencie. W przypadku czynnych substancji chemicznych zawartych w środkach ochrony roślin ilość ta może odpowiadać maksymalnej zalecanej dawce (pojedyncze zastosowanie), a w przypadku wymywania zarówno substancji macierzystej, jak i zalegających pozostałości, powinna być powiązana z powierzchnią zastosowanej kolumny glebowej ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Ilość, jaka ma być wprowadzona do cylindrycznych kolumn glebowych, można obliczyć na podstawie następującego wzoru:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g}/\text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

gdzie:

M = ilość zastosowana na kolumnę [μg]

A = zastosowana dawka [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]

d = średnica kolumny glebowej [cm]

π = 3,14

Chemiczna substancja odniesienia

25. W badaniach wymywania należy zastosować chemiczną substancję odniesienia (zob. pkt 12). Należy ją wprowadzić na powierzchnię kolumny glebowej w podobny sposób jak badaną substancję chemiczną i w odpowiedniej dawce, umożliwiającej właściwe wykrycie albo jako wewnętrzny wzorzec znajdujący się w tej samej kolumnie glebowej, co badana substancja chemiczna, albo oddzielnie w oddzielnej kolumnie glebowej. Zaleca się wprowadzenie obydwu substancji chemicznych w tej samej kolumnie poza przypadkami, w których obydwie substancje chemiczne są oznakowane w podobny sposób.

Gleby*Wybór gleby*

26. W celu zbadania wymywania w odniesieniu do macierzystej badanej substancji chemicznej zastosować należy 3–4 rodzaje gleby różniące się pH, zawartością węgla organicznego i teksturą (12). Wytyczne dotyczące wyboru gleb do eksperymentów wymywania przedstawione zostały poniżej w Tabeli 1. W przypadku badanych substancji chemicznych ulegających jonizacji wybrane rodzaje gleby powinny obejmować szereg pH w celu oceny przemieszczania się substancji chemicznej w jej formie zjonizowanej i niezjonizowanej; co najmniej 3 rodzaje gleby powinny posiadać pH, w przypadku którego badana substancja chemiczna znajduje się w swojej mobilnej postaci.

Tabela 1

Wytyczne dotyczące wyboru rodzajów gleby do badań wymywania

Gleba nr	Wartość pH	Węgiel organiczny %	Zawartość gliny %	Tekstura (*)
1	>,5	3,5 – 5,0	20 – 40	glina ilasta
2	5,5 – 7,0	1,5 – 3,0	15 – 25	pył ilasty
3	4,0 – 5,5	3,0 – 4,0	15 – 30	glina zwykła
4	< 4,0 – 6,0 §	< 0,5 – 1,5 § ‡	< 10 – 15 §	piasek gliniasty
5	< 4,5	> 10 #	< 10	piasek gliniasty/piasek

(*) Zgodnie z systemami FAO i Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (14).

§ Wartości odpowiednich zmiennych powinny w miarę możliwości mieścić się w podanym zakresie. Jeżeli jednak wystąpią trudności ze znalezieniem odpowiedniego materiału glebowego, akceptuje się wartości poniżej wskazanego minimum.

‡ Gleby o zawartości węgla organicznego wynoszącej mniej niż 0,3 % mogą zaburzyć korelację między organiczną zawartością a adsorpcją. W związku z tym zaleca się stosować gleby o minimalnej zawartości węgla organicznego wynoszącej 0,3 %.

Gleby o bardzo wysokiej zawartości węgla (np. > 10 %) mogą nie być akceptowane przez organy regulacyjny, np. w przypadku rejestracji pestycydów.

27. Czasem niezbędne mogą być inne rodzaje gleb, aby reprezentowały chłodniejsze, umiarkowane i tropikalne regiony. W związku z tym, jeżeli zaleca się wykorzystanie innych rodzajów gleb, powinny one charakteryzować się takimi samymi parametrami i wykazywać podobne zmiany we właściwościach, jak opisane w wytycznych dotyczących wyboru gleby do badań wymywania (zob. tabela 1 powyżej), nawet jeżeli nie spełniają dokładnie kryteriów.
28. W przypadku badań wymywania z »zalegającymi pozostałościami« należy zastosować jedną glebę (12). Powinna ona zawierać > 70 % piasku i 0,5–1,5 % węgla organicznego (np. gleba nr 4 w Tabeli 1). Może być konieczne użycie większej liczby rodzajów gleby, jeżeli istotne są dane dotyczące produktów przemiany.

29. Wszystkie gleby należy scharakteryzować co najmniej w odniesieniu do tekstury [% piasku, % mułu, % gliny zgodnie z systemami klasyfikacji FAO i Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (14)], pH, pojemności wymiany kationów, zawartości węgla organicznego, gęstości objętościowej (w przypadku gleby o naruszonej strukturze) oraz pojemności wodnej. Pomiar biomasy mikroorganizmów wymagany jest jedynie w przypadku gleby wykorzystywanej w okresie starzenia/inkubacji przed wykonaniem eksperymentu wymywania zalegających pozostałości. Przy interpretacji wyników tego badania mogą okazać się przydatne informacje dotyczące dodatkowych właściwości gleby (np. klasyfikacja gleby, mineralogia gliny, powierzchnia właściwa). W celu określenia właściwości gleby zastosować można metody zalecane w pozycjach bibliografii (15)(16)(17)(18)(19).

Gromadzenie i przechowywanie gleb

30. Gleby należy pobierać z górnej warstwy (A – poziom próchniczny) do maksymalnej głębokości 20 cm. Należy usunąć pozostałości roślinności, makrofauny i kamieni. Gleby (oprócz wykorzystanych do starzenia badanej substancji chemicznej) suszy się na powietrzu w temperaturze pokojowej (najlepiej 20–25 °C). Rozdrobnienie powinno być przeprowadzane z minimalną siłą, tak aby pierwotna tekstura gleby uległa jak najmniejszym zmianom. Gleby przesiewa się przez sito o oczkach ≤ 2 mm. Zalecana jest staranna homogenizacja, gdyż poprawia ona odtwarzalność wyników. Przed użyciem gleby mogą być przechowywane w temperaturze otoczenia i suszone na powietrzu (12). Nie ma zalecanej granicy czasu przechowywania, lecz gleby przechowywane dłużej niż trzy lata powinny być ponownie przeanalizowane przed użyciem pod względem zawartości węgla organicznego i pH.
31. Powinny być dostępne szczegółowe informacje na temat historii obszarów, z których pobrana została badana próbka gleby. Szczegółowe informacje obejmują dokładną lokalizację [dokładnie określoną w układzie UTM (Universal Transverse Mercator-Projection/European Horizontal Datum) lub za pomocą współrzędnych geograficznych], pokrywę roślinną, zabiegi z użyciem środków ochrony roślin, stosowanie nawozów organicznych i nieorganicznych, dodatki materiału biologicznego lub przypadkowe zanieczyszczenia (12). Gleby, które były poddawane działaniu badanej substancji chemicznej lub jej strukturalnych analogów w ciągu ostatnich czterech lat, nie powinny być stosowane do badań wymywania.

Warunki badania

32. W trakcie badania kolumny glebowe wykorzystywane w badaniu wymywania należy przechowywać bez dostępu światła w temperaturze otoczenia, dopóki utrzymuje się ona w zakresie ± 2 °C. Zalecane temperatury mieszczą się w zakresie 18–25 °C.
33. Nawadnianie sztucznym deszczem (0,01 M CaCl₂) należy stosować w sposób ciągły na powierzchni kolumn glebowych w ilości 200 mm przez okres 48 godzin⁽¹⁾; ilość ta stanowi ekwiwalent zastosowania 251 ml w kolumnie o wewnętrznej średnicy wynoszącej 4 cm. Jeżeli jest to konieczne dla celów badania, można dodatkowo zastosować inne ilości sztucznego deszczu lub dłuższy okres trwania.

Wykonanie badania

Wymywanie w przypadku macierzystej badanej substancji chemicznej

34. Co najmniej dwie kolumny do wymywania wypełnia się niepoddaną działaniu substancji chemicznej, wysuszoną na powietrzu i przesianą glebą (< 2 mm) do wysokości około 30 cm W celu uzyskania jednolitego wypełnienia glebę dodaje się do kolumn w małych porcjach za pomocą łyżki i dociska łokciem, jednocześnie delikatnie wibrując kolumnę do momentu, kiedy górna część słupa gleby już się nie obniża. Jednolite rozmieszczenie jest wymagane ze względu na uzyskanie odtwarzalnych wyników z kolumn do wymywania. W celu uzyskania szczegółowych informacji o technikach wypełniania kolumn glebą, zob. pozycje bibliografii (20), (21) i (22). Aby kontrolować odtwarzalność procedury wypełniania, wyznacza się całkowitą masę gleby umieszczonej w kolumnach⁽²⁾; masa w kolumnach stanowiących duplikaty powinna być podobna.

⁽¹⁾ Symuluje to niezmiernie wysoki opad deszczu. Na przykład w Europie Środkowej średni roczny poziom opadów mieści się w zakresie 800–1 000 mm.

⁽²⁾ Przykłady gęstości objętościowej gleb o naruszonej strukturze są następujące:

dla gleby piaszczystej $1,66 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$

dla gleby piaszczysto-gliniastej $1,58 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$

dla gleby gliniastej $1,17 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$

dla gleby ilastej $1,11 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$

35. Po wypełnieniu kolumny glebowe wstępnie nawilża się sztucznym deszczem (0,01 M CaCl₂) od dołu do góry w celu wyparcia powietrza z porów gleby przez wodę. Następnie kolumny glebowe pozostawia się do ustabilizowania, a nadmiar wody jest odprowadzany grawitacyjnie. Metody nasycenia kolumn przedstawione zostały w pozycji bibliografii (23).
36. Następnie do kolumn glebowych wprowadza się badaną substancję chemiczną lub chemiczną substancję odniesienia (zob. również pkt 23–25). W celu uzyskania równomiernego rozprowadzenia roztworów, zawiesin lub emulsji badanej substancji chemicznej lub substancji chemicznej odniesienia należy rozprowadzić ją równomiernie na powierzchni kolumn glebowych. Jeżeli w przypadku badanej substancji chemicznej zaleca się połączenie jej z glebą, należy wymieszać ją z niewielką ilością (np. 20 g) gleby i umieścić na powierzchni kolumny glebowej.
37. Powierzchnię kolumn glebowych przykrywa się następnie krążkiem ze spiekanego szkła, kulkami szklanymi, filtrami z włókna szklanego lub krążkami bibuły filtracyjnej w celu równomiernego rozmieszczenia sztucznego deszczu na całej powierzchni oraz uniknięcia naruszenia powierzchni gleby przez krople deszczu. Im większa średnica kolumny, tym większą ostrożność należy zachować przy nawadnianiu sztucznym deszczem kolumn glebowych, aby zapewnić równomierne rozprowadzenie sztucznego deszczu na powierzchni gleby. Następnie nawadnia się kolumny glebowe sztucznym deszczem metodą kropłową za pomocą tłoka, pompy perystaltycznej lub wkraplacza. Zaleca się zbieranie odcieków we frakcjach oraz zapisywanie ich poszczególnych objętości (¹).
38. Po wymyciu i odsączeniu kolumn, kolumny glebowe dzieli się na odpowiednią liczbę segmentów, w zależności od informacji, które chce się uzyskać z badania; segmenty poddaje się ekstrakcji za pomocą odpowiednich rozpuszczalników lub mieszanin rozpuszczalników i analizuje pod kątem obecności badanej substancji chemicznej oraz, w stosownych przypadkach, pod kątem produktów przemiany, całkowitej promieniotwórczości i substancji chemicznej odniesienia. Ocieki i frakcje odcieków analizuje się bezpośrednio lub po ekstrakcji tych samych produktów. W przypadku zastosowania oznakowanych izotopowo badanych substancji chemicznych należy określić wszystkie frakcje zawierające $\geq 10\%$ zastosowanej promieniotwórczości.

Wymywanie w przypadku zalegających pozostałości

39. Świeża gleba (nie wysuszona wcześniej na powietrzu) poddawana jest działaniu badanej substancji chemicznej oznakowanej izotopowo w dawce odpowiadającej powierzchni kolumn glebowych (zob. pkt 24) i poddawana inkubacji w warunkach tlenowych zgodnie z metodą badawczą C.23 (13). Okres inkubacji (starzenia) powinien być wystarczająco długi, aby umożliwić wytworzenie znacznych ilości produktów przemiany; zaleca się zastosowanie okresu starzenia odpowiadającego czasowi połowicznego rozpadu badanej substancji chemicznej (²), nie powinien on jednak przekraczać 120 dni. Przed wymywaniem należy przeanalizować postarzoną glebę pod kątem badanej substancji chemicznej i produktów jej przemiany.
40. Kolumny do wymywania wypełnia się do wysokości 28 cm tą samą glebą (ale suszoną na powietrzu), którą wykorzystano w doświadczeniu starzenia opisanym w pkt 34, a także oznacza się również całkowitą masę wypełnionych kolumn glebowych. Kolumny glebowe nawilża się wstępnie jak opisano w pkt 35.
41. Następnie badaną substancję chemiczną i produkty jej przemiany wprowadza się na powierzchnię kolumn glebowych w formie zalegających pozostałości glebowych (zob. pkt 39) jako segment gleby o grubości 2 cm. Całkowita wysokość kolumn glebowych (gleba nie poddana działaniu substancji chemicznej + postarzona gleba) nie powinna przekraczać 30 cm (zob. pkt 34).
42. Wymywanie przeprowadza się w sposób opisany w pkt 37.
43. Po wymyciu segmenty gleby i ocieki analizuje się, jak opisano w pkt 38, pod kątem badanej substancji chemicznej, produktów jej przemiany i nieekstrahowanej promieniotwórczości. W celu określenia, ile zalegających pozostałości zatrzymanych zostało w 2 cm górnej warstwie po wymyciu, należy ten segment przeanalizować odrębnie.

(¹) Typowe objętości odcieków mieszczą się w zakresie 230–260 ml, co odpowiada około 92–104 % łącznego zastosowanego nawadniania sztucznym deszczem (251 ml) w przypadku kolumn glebowych o średnicy 4 cm i długości 30 cm.

(²) W glebie może powstać więcej niż jeden główny produkt przemiany, który może również występować w różnych momentach w trakcie badania przemiany. W takich przypadkach konieczne może być przeprowadzenie badań wymywania z zastosowaniem zalegających pozostałości powstałych w różnym czasie.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

44. Ilości badanej substancji chemicznej, produktów przemiany, nieekstrahowalnych pozostałości oraz, jeżeli wykorzystana została w badaniu, chemicznej substancji odniesienia należy podać w % zastosowanej początkowej dawki w odniesieniu do każdego segmentu gleby i frakcji odcieku. W odniesieniu do każdej kolumny należy przedstawić wykres z naniesionymi uzyskanymi wartościami procentowymi w funkcji głębokości warstwy gleby.
45. Jeżeli w badaniach wymywania w kolumnie zastosowana została chemiczna substancja odniesienia, wymywanie substancji chemicznej może zostać ocenione we względnej skali z wykorzystaniem czynników względnej mobilności (RMF; zob. definicja w dodatku 3) (1)(11), co umożliwia porównanie danych dotyczących wymywania różnych substancji chemicznych uzyskanych w odniesieniu do różnych rodzajów gleby. Przykłady wartości czynników względnej mobilności w odniesieniu do różnych chemicznych środków ochrony roślin podane zostały w dodatku 3.
46. Szacunkowe wartości K_{oc} (współczynnika adsorpcji znormalizowanego zawartością węgla organicznego) i K_{om} (współczynnika rozkładu znormalizowanego substancją organiczną) można również uzyskać na podstawie wyników wymywania w kolumnie, wykorzystując średnią drogę wymywania lub ustalone korelacje między czynnikiem względnej mobilności RMF oraz odpowiednio K_{om} i K_{oc} (4), lub stosując teorię chromatografii (24). Jednak należy zachować ostrożność, stosując tę drugą metodę, biorąc zwłaszcza pod uwagę fakt, że proces wymywania nie obejmuje samych tylko warunków nasyconego przepływu, a raczej układy nienasycone.

Interpretacja wyników

47. Opisane w niniejszej metodzie badania wymywania w kolumnie umożliwiają określenie potencjału wymywania lub mobilności badanej substancji chemicznej w glebie (w badaniu wymywania substancji macierzystej) lub produktów jej przemiany (w badaniu wymywania zalegających pozostałości). Badania te nie pozwalają przewidzieć pod względem ilościowym działania wymywającego w warunkach terenowych, ale mogą zostać wykorzystane dla porównania »zdolności do wymywania« jednej substancji chemicznej z innymi substancjami chemicznymi o znanym działaniu wymywającym (24). Podobnie nie pozwalają określić ilościowo procentowej części zastosowanej substancji chemicznej, która może dotrzeć do wody gruntowej (11). Wyniki badań wymywania w kolumnie mogą jednak pomóc w podjęciu decyzji, czy należy wykonać dodatkowe badanie w warunkach terenowych lub zbliżonych do terenowych w odniesieniu do substancji chemicznych wykazujących wysoki potencjał mobilności w badaniach laboratoryjnych.

Sprawozdanie z badania

48. Sprawozdanie musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna oraz chemiczna substancja odniesienia (jeżeli została wykorzystana)

- nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna (nomenklatura IUPAC i CAS), numer CAS, struktura chemiczna (wskazanie pozycji znacznika w przypadku zastosowania materiału znakowanego izotopowo) oraz istotne właściwości fizykochemiczne;
- czystość (zanieczyszczenia) badanej substancji chemicznej;
- radiochemiczna czystość oznakowanej substancji chemicznej oraz aktywność właściwa (w razie potrzeby).

Badane gleby:

- szczegółowe informacje dotyczące miejsca pobrania;
- właściwości gleb, takie jak pH, zawartość węgla organicznego i gliny, tekstura oraz gęstość objętościowa (w przypadku gleby o naruszonej strukturze);
- aktywność mikroorganizmów w glebie (tylko w przypadku gleby wykorzystywanej do starzenia badanej substancji chemicznej);
- czas i warunki przechowywania gleby.

Warunki badania:

- daty wykonywania badań;
- długość i średnica kolumn do wymywania;
- całkowita masa gleby w kolumnach glebowych;
- ilość wprowadzanej badanej substancji chemicznej oraz, w stosownych przypadkach, chemicznej substancji odniesienia;

- ilość, częstotliwość i czas zastosowania sztucznego deszczu;
- temperatura prowadzenia eksperymentu;
- liczba powtórzeń (co najmniej dwa);
- metody analizy badanej substancji chemicznej, produktów przemiany oraz, w stosownych przypadkach, chemicznej substancji odniesienia w różnych segmentach gleby i odciekach;
- metody charakteryzowania i identyfikacji produktów przemiany w segmentach gleb i odciekach.

Wyniki badania:

- tabele wyników wyrażonych jako stężenia oraz jako % zastosowanej dawki w odniesieniu do segmentów gleby i odcieków;
- bilans masy, w stosownych przypadkach;
- objętości odcieku;
- długość dróg wymywania oraz, w stosownych przypadkach, czynniki względnej mobilności;
- graficzny wykres zawartości % w segmentach gleby w funkcji głębokości segmentu gleby;
- omówienie i interpretacja wyników.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N. i 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 (w przygotowaniu). W: Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts i P.C. Kearney, red.). J. Wiley & Sons.
- (3) Briggs G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- (4) Chiou, C.T., Porter, P.E. i 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) Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (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) Załącznik I do dyrektywy Komisji 95/36/WE z dnia 14 lipca 1995 r. zmieniającej dyrektywę Rady 91/414/EWG dotyczącą wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin (Tekst mający znaczenie dla EOG), Dz.U. L 172 z 22.7.1995, s. 8.
- (9) Nederlandzka Komisja ds. Rejestracji Pestycydów (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) BBA (1986). Richtlinien für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- (11) SETAC (1995). Procedury oceny losów w środowisku i ekotoksyczności pestycydów. Mark R. Lynch, red.
- (12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Włochy, 18–20 styczeń 1995 r.

(13) Następujące rozdziały niniejszego załącznika:

Rozdział A.4, Prężność par

Rozdział A.6, Rozpuszczalność w wodzie

Rozdział A.8, Współczynnik podziału, metoda wytrząsania w kolbie

Rozdział A.24, Współczynnik podziału, wysokosprawna chromatografia cieczowa

Rozdział C.7, Degradacja — degradacja abiotyczna: hydroliza jako funkcja pH

Rozdział C.18, Adsorpcja/desorpcja z wykorzystaniem metody równowagi partii

Rozdział C.23, Tlenowa i beztlenowa przemiana w glebie

- (14) Soil Texture Classification (systemy US i FAO). Weed Science, 33, suplement 1 (1985) oraz Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).
- (15) Methods of Soil Analysis (1986). Część 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, red.). Agronomy Series Nr 9, wydanie 2.
- (16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller i D.R. Kelney (red.). Seria dotycząca agronomii, nr 9, wydanie 2.
- (17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. Wydanie 1.
- (18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt nad Menem.
- (19) Scheffer, F. i P. Schachtschabel (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (20) Weber, J.B. i T.F. Peeper (1977). (1977). Research Methods in Weed Science, wydanie 2. (B. Truelove, red.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.
- (21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. i Sartori, J.L. (1986). W: Research Methods in Weed Science, wydanie 3. (N. D. Camper, red.). 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. W: Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, red.), 115-133. Plenum Press, Nowy York.
- (25) OECD (1981). Dissociation constants in water. Wytyczne OECD dotyczące badania substancji chemicznych, nr 4112, OECD, Paryż.
-

Dodatek 1

Definicje i jednostki

Zalegające pozostałości w glebie: badana substancja chemiczna i produkty przemiany obecne w glebie po zastosowaniu i po wystarczająco długim okresie umożliwiającym transport, adsorpcję, metabolizm i procesy rozproszenia, aby nastąpiła zmiana rozmieszczenia i chemicznego charakteru części zastosowanej substancji chemicznej (1).

Sztuczny deszcz: 0,01 M roztworu CaCl_2 w destylowanej lub dejonizowanej wodzie.

Średnia droga wymywania: dolna część sekcji gleby, w której łączna ilość odzyskanej substancji chemicznej = 50 % odzyskanej badanej substancji chemicznej ogółem [zwykły eksperyment wymywania] lub (dolna część sekcji gleby, w której łączna ilość odzyskanej substancji chemicznej = 50 % odzyskanej substancji chemicznej ogółem) – ((grubość warstwy zalegających pozostałości)/2) [badanie wymywania zalegających pozostałości]

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Odciek: faza wodna przesączona przez profil glebowy lub kolumnę glebową (1).

Wymywanie: proces w wyniku którego substancja chemiczna przemieszcza się w dół profilu glebowego lub kolumny glebowej (1).

Droga wymywania: najgłębiej położony segment gleby, w którym po procesie wymywania wykryto $\geq 0,5$ % zastosowanej badanej substancji chemicznej lub zalegających pozostałości (ekwiwalent głębokości przenikania).

Granica wykrywalności i granica oznaczalności: granica wykrywalności jest to stężenie substancji chemicznej, poniżej którego nie można odróżnić substancji chemicznej od artefaktów analitycznych. Granica oznaczalności jest to stężenie substancji chemicznej, poniżej którego nie można oznaczyć stężenia z zadowalającą dokładnością.

Czynnik względnej mobilności: (droga wymywania badanej substancji chemicznej (cm)) / (droga wymywania chemicznej substancji odniesienia (cm))

Badana substancja chemiczna: oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej

Produkt przemiany: wszystkie substancje chemiczne powstałe w wyniku biotycznych lub abiotycznych reakcji przemiany badanej substancji chemicznej, w tym CO_2 i produkty związane w pozostałościach.

Gleba: jest mieszaniną mineralnych i organicznych składników chemicznych, przy czym te ostatnie zawierają związki o wysokiej zawartości węgla i azotu oraz o dużych masach cząsteczkowych, zamieszkała przez drobne (najczęściej mikro-) organizmy. Gleba może być wykorzystana w dwóch stanach:

- niezakłóconym, w jakim powstawała z upływem czasu, z charakterystycznymi warstwami różnych rodzajów gleb;
- zakłóconym, jak to ma na ogół miejsce na polach uprawnych lub kiedy próbki są pobierane przez kopanie i stosowane w tej metodzie badawczej (2).

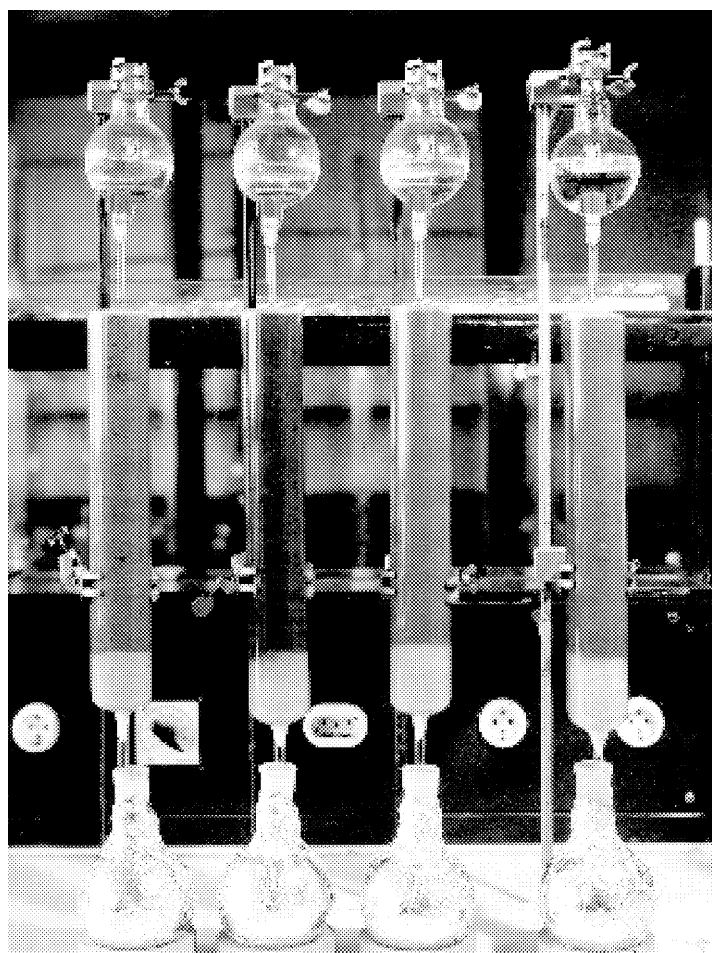
(1) Holland P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (przyjęta 12 maja 1981 r.).

Dodatek 2

Rysunek 1

**Przykład niepodzielnych kolumn do wymywania wykonanych ze szkła
o długości 35 cm i wewnętrznej średnicy 5 cm (1)**



← Ampolas gotejantes para aplicação de chuva artificial

← Disco de vidro sinterizado para evitar perturbações da superfície do solo e distribuir uniformemente a chuva artificial

← Coluna de vidro cheia do solo ensaiado (quando se ensaiam produtos fotolábeis, é necessário proteger as colunas com folha de alumínio)

← Camada de areia quartzítica

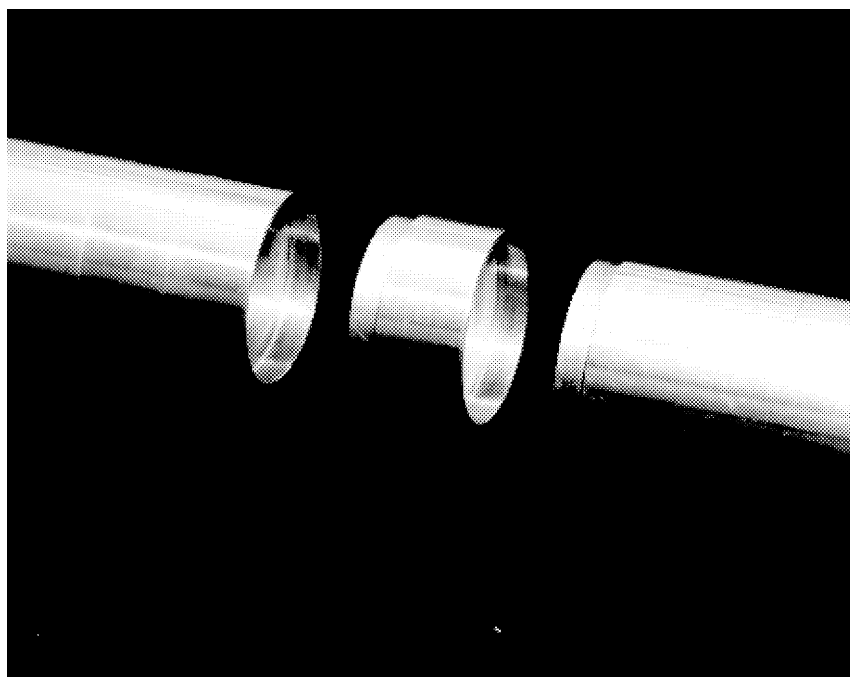
← Tampão de fibra de vidro para retenção do solo na coluna

← Balão de fundo redondo para recolha do lixiviado, envolvido em folha de alumínio para impedir a fotólise

- (1) Drescher N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. W: Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225–236. Verlag Wissenschaft und Politik, Kolonia.

Rysunek 2

Przykład podzielnej kolumny z metalu o wewnętrznej średnicy 4 cm (1)



- (1) Burkhard, N., Eberle D.O. i Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

—

Dodatek 3

Przykłady wartości czynników względnej mobilności (RMF) (*) chemicznych środków ochrony roślin (1)(2) i odpowiednie klasy mobilności +

Zakres RMF	Substancja chemiczna (RMF)	Klasa mobilności
≤ 0,15	Paration (< 0,15), Flurodifen (0,15)	I niemobilna
0,1 – 50,8	Profenofos (0,18), Propikonazol (0,23), Diazynon (0,28), Diuron (0,38), Terbutylazyna (0,52), Metydation (0,56), Prometryn (0,59), Propazyna (0,64) Alachlor (0,66), Metolachlor (0,68)	II słabo mobilna
0,8 – 1,3	Monuron (**) (1,00), Atrazyna (1,03), Symazyna (1,04), Fluometuron (1,18)	III umiarkowanie mobilna
1,3 – 2,5	Prometon (1,67), Cyjanazyna (1,85), Bromacil (1,91) Karbutilat (1,98)	IV dość mobilna
2,5 – 5,0	Karbofuran (3,00), Dioksakarb (4,33)	V mobilna
> 5,0	Monokrotofos (> 5,0), Dikrotofos (> 5,0)	VI bardzo mobilna

(*) Czynnik względnej mobilności wyprowadza się w następujący sposób (3):

$$RMF = \frac{\text{droga wymywania badanej substancji chemicznej (cm)}}{\text{droga wymywania chemicznej substancji odniesienia (cm)}}$$

(**) Chemiczna substancja odniesienia

+ Podstawą innych systemów klasyfikacji mobilności substancji chemicznej w glebie są wartości R_f z chromatografii cienkowarstwowej gleby (4) i wartości K_{oc} (5)(6).

- (1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. Na wspólnym międzynarodowym sympozjum pt. »Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment«. Canterbury, Zjednoczone Królestwo, 1–3 lipca 1985 r.
- (2) Guth, J.A. i 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. i Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. W: Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Materiały z sympozjum AOAC, AOAC, Waszyngton 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. OSZACOWANIE EMISJI DO ŚRODOWISKA Z DREWNA PODDANEGO DZIAŁANIU ŚRODKÓW KONSERWUJĄCYCH: METODA LABORATORYJNA STOSOWANA W ODNIESIENIU DO PRODUKTÓW Z DREWNA. KTÓRE NIE SĄ POKRYTE I MAJĄ STYCZNOŚĆ Z WODĄ SŁODKĄ LUB WODĄ MORSKĄ

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 313 (2007 r.) w sprawie badań. Emisje do środowiska z drewna poddanego działaniu środka konserwującego należy określać ilościowo, aby umożliwić ocenę ryzyka środowiskowego, jakie stwarza zakonserwowane drewno. W niniejszej metodzie badawczej opisano laboratoryjną metodę szacowania emisji z drewna poddanego działaniu środka konserwującego w dwóch sytuacjach, w których zanieczyszczenia mogą przeniknąć do środowiska:
 - emisje z zakonserwowanego drewna, mającego styczność z wodą słodką. Emisje z powierzchni zakonserwowanego drewna mogą przedostać się do wody.
 - emisje z zakonserwowanego drewna, mającego styczność z wodą morską. Emisje z powierzchni zakonserwowanego drewna mogą przedostać się do wody morskiej.
2. Niniejsza metoda badawcza ma na celu zbadanie emisji z drewna i produktów z drewna, które nie są pokryte i mają styczność z wodą słodką lub morską. Klasy użytkowania stosowane są w skali międzynarodowej i służą do klasyfikacji zagrożeń biologicznych, na które narażony będzie towar poddany działaniu substancji. Klasy użytkowania definiują także sytuacje, w których zakonserwowany produkt jest użytkowany, oraz określają elementy środowiska (powietrze, woda, gleba), dla których drewno poddane działaniu środka konserwującego stanowi potencjalne ryzyko.
3. Metoda badawcza stanowi laboratoryjną procedurę pozyskiwania próbek (substancji emitowanych) z wody, w której zanurzone zostało drewno poddane działaniu substancji, w rosnących odstępach czasowych po narażeniu. Ilość emisji w substancji emitowanej powiązana jest z wielkością powierzchni drewna i długością narażenia w celu oszacowania przepływu w $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dzień}$. Przepływ (tempo wymywania) można zatem oszacować na podstawie rosnących okresów narażenia.
4. Ilość emisji może zostać wykorzystana do oceny ryzyka środowiskowego drewna poddanego działaniu substancji.

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

5. Nie zakłada się identycznego charakteru i intensywności mechanizmu wymywania z powierzchni drewna przez wodę słodką i przez wodę morską. Zatem w przypadku wyrobów konserwujących do drewna lub ich mieszanin wykorzystywanych do zabezpieczania drewna wykorzystywanego w środowisku morskim konieczne jest przeprowadzenie badania wymywania w wodzie morskiej.
6. W przypadku drewna zakonserwowanego środkiem konserwującym należy wykorzystywać drewno reprezentatywne dla drewna znajdującego się w handlu. Drewno powinno być zakonserwowane zgodnie z instrukcją producenta środka konserwującego oraz zgodnie z odpowiednimi standardami i specyfikacjami. Przed rozpoczęciem badania ustalić należy parametry kondycjonowania drewna po konserwacji.
7. Próbkę drewna powinny być reprezentatywne dla użytkowanych wyrobów (np. w odniesieniu do gatunku, gęstości i innych cech charakterystycznych).
8. Badanie można zastosować do drewna, stosując proces nasycania albo nakładania powierzchniowego, albo do drewna impregnowanego, którego powierzchnia została dodatkowo obowiązkowo zabezpieczona (np. farbą, którą stosuje się obowiązkowo w celach handlowych).
9. Skład, ilość, pH i fizyczna forma wody są istotne przy oznaczaniu ilości, zawartości i charakteru emisji z drewna.

ZASADA METODY BADANIA

10. Próbkę drewna impregnowanego środkiem konserwującym przeznaczone do badań zanurzone są w wodzie. Wodę (próbkę substancji emitowanej) pobiera się i wielokrotnie analizuje pod względem chemicznym przez okres narażenia wystarczająco długi, aby wykonać obliczenia statystyczne. Poziomy emisji w $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dzień}$ oblicza się na podstawie wyników badań. Należy odnotowywać okresy pobierania próbek. Badania z próbkami nie poddanymi działaniu środka można przerwać, jeżeli w trzech pierwszych punktach danych nie wykryto żadnego tła.

11. Włączenie do badania próbek drewna niezakonserwowanego umożliwia określenie poziomów tła w przypadku emisji z drewna innej niż wynikająca z zastosowanego środka konserwującego.

KRYTERIA JAKOŚCI

Dokładność

12. Dokładność metody badawczej służącej do oszacowania emisji zależy od reprezentatywności próbek do badań w odniesieniu do drewna impregnowanego obecnego w handlu, reprezentatywności wody w odniesieniu do wody w warunkach rzeczywistych oraz reprezentatywności systemu narażenia w stosunku do warunków naturalnych.
13. Dokładność, precyzję i powtarzalność metody analitycznej należy określić przed wykonaniem badania.

Odtwarzalność

14. Pobiera się i analizuje trzy próbki wody, a średnią wartość przyjmuje się jako wartość emisji. Odtwarzalność wyników w przypadku jednego laboratorium i w różnych laboratoriach zależy od schematu zanurzania oraz drewna wykorzystanego jako próbki do badań.

Akceptowalny zakres wyników

15. Za akceptowalny uznaje się taki zakres wyników badania, w przypadku którego różnica pomiędzy górną a dolną wartością wynosi mniej niż jeden rząd wielkości.

WARUNKI BADANIA

Woda

16. Scenariusz wymywania w wodzie słodkiej: w badaniach wymywania, w których przeprowadza się ocenę drewna narażonego na kontakt z wodą słodką, zaleca się stosowanie wody dejonizowanej (np. ASTM D 1193 Type II). Temperatura wody powinna wynosić 20 ± 2 °C, a zmierzone pH i temperaturę wody należy podać w sprawozdaniu z badania. Analiza próbek użytej wody pobranych przed zanurzeniem badanych próbek drewna umożliwia oszacowanie zawartości analizowanej substancji chemicznej w wodzie. Stanowi ona próbę kontrolną do oznaczenia poziomów tła substancji chemicznych, które są następnie analizowane pod względem chemicznym.
17. Scenariusz wymywania z wodą morską: w badaniach wymywania, w których przeprowadza się ocenę drewna narażonego na kontakt z wodą morską, zaleca się stosowanie syntetycznej wody morskiej (np. ASTM D 1141 Substitute Ocean Water, without Heavy Metals). Temperatura wody powinna wynosić 20 ± 2 °C, a zmierzone pH i temperaturę wody należy podać w sprawozdaniu z badania. Analiza próbek użytej wody pobranych przed zanurzeniem badanych próbek drewna umożliwia oszacowanie zawartości analizowanej substancji chemicznej w wodzie. Stanowi ona próbę kontrolną do oznaczania poziomów tła istotnych substancji chemicznych.

Próbki drewna użytego do badań

18. Gatunki drewna powinny być typowe dla gatunków drewna wykorzystywanych w badaniach skuteczności środków konserwujących do drewna. Do zalecanych gatunków zaliczają się *Pinus sylvestris* L. (sosna zwyczajna), *Pinus resinosa* Ait. (sosna czerwona) lub *Pinus spp* (sosna południowa). Można wykonać dodatkowe badania, wykorzystując inne gatunki.
19. Wykorzystać należy drewno o prostych włóknach bez sęków. Należy unikać stosowania materiału z widocznymi wyciekami żywicy. Drewno powinno być typowe dla drewna dostępnego w handlu. Należy zanotować źródło pochodzenia, gęstość i liczbę rocznych pierścieni przypadających na 10 mm.
20. Zaleca się, aby próbki drewna użyte do badań stanowiły zestawy pięciu bloków o wymiarach zgodnych z normą PN-EN 113:2000 (25 mm × 50 mm × 15 mm) z powierzchniami wzdłużnymi równoległymi do słoików drewna, chociaż można również stosować inne wymiary, np. 50 mm na 150 mm na 10 mm. Próbkę drewna użytą do badań należy całkowicie zanurzyć w wodzie. Próbki drewna użyte do badań powinny składać się w 100 % z bieli. Każdą próbkę drewna można oznakować w wyjątkowy sposób, tak aby można było ją identyfikować w trakcie badania.
21. Wszystkie próbki drewna użyte do badań powinny być oheblowane lub tarte, a ich powierzchnia nie powinna być oszlifowana.

22. W analizie wykorzystać należy co najmniej pięć zestawów próbek drewna użytych do badania: trzy zestawy próbek drewna należy poddać działaniu środka konserwującego, jednego zestawu próbek drewna nie należy poddawać działaniu tego środka, a jeden należy wykorzystać w celu oszacowania zawartości wilgoci próbek drewna użytych do badania po wysuszeniu w piecu przed ich impregnacją środkiem. Przygotowuje się wystarczającą liczbę próbek drewna do badań, aby umożliwić wybór trzech zestawów mieszczących się w zakresie 5 % średniej wartości retencji środka konserwującego grupy próbek do badań.
23. Wszystkie próbki drewna do badań zostają uszczelnione na końcach substancją chemiczną zapobiegającą przeniknięciu środka konserwującego do końcowego słoja próbki lub zapobiegającą wymywaniu środka z próbki przez końcowy słoje. Konieczne jest odróżnianie próbek drewna użytych do powierzchniowego stosowania i do nasycania w odniesieniu do stosowania środka uszczelniającego końce próbki. Środek uszczelniający końce próbek drewna należy stosować przed rozpoczęciem zabiegu jedynie w przypadku powierzchniowego zastosowania środka konserwującego.
24. Usłojenie końcowej części musi pozostać dostępne do zabiegu nasycania. W związku z tym próbki drewna należy uszczelnić na końcach po zakończeniu okresu kondycjonowania. Emisję należy oszacować tylko w odniesieniu do wzdłużnej powierzchni. Substancje uszczelniające należy sprawdzić i w razie potrzeby ponownie zastosować przed rozpoczęciem wymywania; nie należy ich ponownie stosować po rozpoczęciu wymywania.

Pojemnik do zanurzania próbek

25. Pojemnik wykonany jest z obojętnego materiału i jest wystarczająco duży, aby pomieścić 5 próbek drewna, spełniających wymagania normy PN-EN 113:2000 w 500 ml wody, dając w rezultacie stosunek obszaru powierzchni do objętości wody 0,4 cm²/ml.

Konstrukcja do ułożenia próbek drewna

26. Próbki drewna do badań są umieszczane na konstrukcji umożliwiającej kontakt z wodą wszystkich odsłoniętych powierzchni próbki.

PROCEDURA KONSERWACJI ŚRODKAMI KONSERWUJĄCYMI

Przygotowanie zakonserwowanych próbek do badań

27. Próbkę drewna do badań, którą w ramach badania należy zakonserwować środkiem konserwującym, poddaje się procesowi konserwacji metodą określoną dla danego środka konserwującego, którą może być nasycanie lub nakładanie powierzchniowe przez zanurzenie, za pomocą urządzenia rozpylającego lub pędzla.

Środki konserwujące, które należy zastosować w przypadku konserwacji przez nasycanie

28. Należy przygotować roztwór środka konserwującego, który zapewni określoną absorpcję lub retencję, jeżeli zostanie zastosowany w procedurze konserwacji przez nasycanie. Próbkę drewna do badań zostaje zważona i zmierzona. Proces konserwacji przez nasycanie powinien być zgodny z procesem określonym dla środków konserwujących do drewna przeznaczonych do użytku w klasie użytkowania 4 lub 5. Próbkę drewna ponownie waży się po jej zakonserwowaniu, a retencję środka konserwującego (kg/m³) oblicza się według równania:

$$\frac{\text{Masa po obróbce (kg)} - \text{Masa przed obróbką (kg)}}{\text{Objętość próbki do badań (m}^3\text{)}} \times \frac{\text{Roztwór Stężenie (\% masa/ masa)}}{100}$$

29. Należy zauważyć, że w badaniu można wykorzystać drewno konserwowane w zakładzie konserwacji drewna (np. przy zastosowaniu impregnacji próżniowo – ciśnieniowej). Należy zanotować wykorzystane procedury, a retencję materiału zakonserwowanego w taki sposób należy przeanalizować i zapisać.

Środki konserwujące, które należy stosować w przypadku procesu stosowania powierzchniowego

30. Proces stosowania powierzchniowego obejmuje zanurzenie, natryskiwanie lub malowanie pędzlem próbek drewna. Proces i ilość środka (np. litry/m²) powinny być zgodne z wymogami dotyczącymi powierzchniowego stosowania środka konserwującego.

31. Należy również zauważyć, że w badaniu tym wykorzystać można drewno konserwowane w zakładzie konserwacji drewna. Należy zanotować wykorzystane procedury, a retencję materiału zakonserwowanego w taki sposób należy przeanalizować i zapisać.

Kondycjonowanie próbek do badań po konserwacji

32. Po zakonserwowaniu próbki do badań należy kondycjonować zgodnie z zaleceniami dostawcy badanego środka konserwującego, zgodnie z wymogami określonymi na etykiecie środka konserwującego lub zgodnie ze stosowanymi w handlu praktykami konserwacyjnymi, lub zgodnie z normą PN-EN 252:1994.

Przygotowanie i wybór próbek drewna do badań

33. Po kondycjonowaniu następującym po konserwacji oblicza się średnią retencję grupy próbek do badań, a trzy reprezentatywne zestawy próbek o retencji mieszczącej się w zakresie 5 % średniej grupy wybiera się losowo do pomiarów wymywania.

PROCEDURA POMIARÓW EMISJI ŚRODKÓW KONSERWUJĄCYCH

Metoda zanurzenia

34. Próbkę drewna do badań waży się, a następnie całkowicie zanurza w wodzie, rejestrując datę i czas. Pojemnik przykrywa się, aby zmniejszyć parowanie.
35. Wodę wymienia się w następujących odstępach: 6 godzin, 1 dzień, 2 dni, 4 dni, 8 dni, 15 dni, 22 dni, 29 dni (uwaga: są to łączne okresy czasu, a nie odstępy czasu). Należy zarejestrować datę i czas wymiany wody oraz masę wody odzyskanej z pojemnika.
36. Po każdej wymianie wody próbkę wody, w której zanurzony został zestaw próbek do badań, zachowuje się w celu późniejszej analizy chemicznej.
37. Procedura pobierania próbek umożliwia obliczenie profilu ilości emisji w stosunku do czasu. Próbkę należy przechowywać w warunkach chroniących analit, np. w chłodziarce bez dostępu światła w celu ograniczenia rozwoju mikroorganizmów w próbce przed analizą.

POMIARY EMISJI

Próbki zakonserwowane

38. W stosownych przypadkach pobraną wodę analizuje się pod względem chemicznym pod kątem substancji czynnych lub odnośnych produktów degradacji/przemiany.

Próbki niekonserwowane

39. Pobieranie wody (próbek substancji emitowanej) w tym układzie i późniejsza analiza substancji chemicznych, które zostały wymyte z próbek drewna niekonserwowanego, umożliwiają oszacowanie ewentualnego poziomu emisji środka konserwującego z drewna niekonserwowanego. Pobranie i analiza próbek substancji emitowanej po rosnących okresach narażenia umożliwia oszacowanie dynamiki zmian poziomu emisji w czasie. Analiza ta stanowi procedurę kontrolną, mającą na celu określenie poziomów tła badanej substancji chemicznej w drewnie niekonserwowanym w celu potwierdzenia, że drewno użyte jako źródło próbek nie zostało wcześniej poddane działaniu środka konserwującego.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Analizy chemiczne

40. Pobraną wodę analizuje się pod względem chemicznym, a wynik analizy wyraża się w odpowiednich jednostkach, np. w µg/l.

Przekazywanie danych

41. Wszystkie wyniki są rejestrowane. W dodatku przedstawiony został przykład formy zapisu dla jednego zestawu próbek do badań i tabela zestawieniowa do obliczania średnich wartości emisji dla każdego przedziału czasowego pobierania próbek.
42. Dobowy strumień emisji w $\text{mg/m}^2/\text{dobę}$ oblicza się, przyjmując średnią z trzech pomiarów trzech kontrprób i dzieląc ją przez liczbę dni zanurzenia.

Sprawozdanie z badania

43. Sprawozdanie z badania powinno zawierać co najmniej następujące informacje:
 - nazwa dostawcy badanego środka do konserwacji;
 - szczególna i niepowtarzalna nazwa lub niepowtarzalny kod badanego środka do konserwacji;
 - nazwa handlowa lub nazwa zwyczajowa substancji czynnych z ogólnym opisem składników obojętnych (np. rozpuszczalnika obojętnego, żywicy) oraz zawartość składników wyrażona w % m/m;
 - właściwa retencja lub obciążenie (odpowiednio w kg/m^3 lub l/m^2) określone w przypadku drewna zastosowanego w kontakcie z wodą;
 - użyte gatunki drewna, gęstość i tempo wzrostu w pierścieniach na 10 mm;
 - obciążenie lub retencja badanego środka konserwującego i wzór zastosowany do obliczenia retencji wyrażonej w l/m^2 lub kg/m^3 ;
 - metoda zastosowania środka konserwującego, określająca zastosowany harmonogram narażania na działanie substancji w przypadku nasączenia i metodę nakładania w przypadku konserwacji powierzchniowej;
 - data zastosowania środka konserwującego i oszacowanie zawartości wilgoci w próbkach do badań wyrażonej w procentach;
 - zastosowane procedury kondycjonowania z określeniem rodzaju, warunków i czasu trwania;
 - specyfikacja zastosowanego końcowego uszczelniacza i liczba zastosowań;
 - specyfikacja każdego późniejszego procesu konserwacji drewna, np. specyfikacja dostawcy, rodzaju, cech charakterystycznych i ilości farby;
 - czas i data każdego zanurzenia, ilość wody zastosowana do zanurzenia próbek do badań przy każdym zanurzeniu i ilość wody wchłoniętej przez drewno podczas zanurzenia;
 - wszelkie zmiany w stosunku do opisanej metody i wszelkie czynniki, które mogły wpływać na wyniki.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Norma europejska EN 84–1997. Środki do konserwacji drewna Przyspieszone starzenie drewna poddanego działaniu substancji przed testami biologicznymi. Procedura wymywania.
- (2) Norma europejska EN 113/A1–2004. Środki do konserwacji drewna Metoda badawcza mająca na celu określenie efektywności ochrony przeciwko grzybom podstawkowym niszczącym drewno. Określenie toksycznych wartości.
- (3) Norma europejska EN 252–1989. Metoda badań eksploatacyjnych w celu badania względnej efektywności ochrony środka do konserwacji drewna w styczności z ziemią.
- (4) Norma europejska EN 335 – Część 1: 2006. Trwałość drewna i materiałów drewnopochodnych – Klasy użytkowania: definicje – Część 1: Postanowienia ogólne.

-
- (5) Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów, ASTM D 1141–1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, tom 11.02.
 - (6) Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów, ASTM D 1193-77 Type II–1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, tom 11.01.
-

Dodatek 1

Formularz danych dla metody badawczej

Oszacowanie emisji do środowiska z drewna poddanego działaniu środków do konserwacji: metoda laboratoryjna stosowana w przypadku produktów z drewna, które nie są pokryte i mają styczność z wodą słodką lub wodą morską

Laboratorium	
Środek do konserwacji drewna	
Dostawca środka do konserwacji	
Szczególna i niepowtarzalna nazwa lub niepowtarzalny kod środka do konserwacji	
Nazwa handlowa lub nazwa zwyczajowa środka do konserwacji	
Składniki obojętne	
Właściwa retencja w przypadku drewna zastosowanego w kontakcie z wodą	
Zastosowanie	
Metoda zastosowania	
Data zastosowania	
Wzór zastosowany do obliczenia retencji:	
Procedura kondycjonowania	
Czas trwania kondycjonowania	
Środek uszczelniający końce próbki/liczba zastosowań	
Kolejna konserwacja	w stosownych przypadkach
Próbki do badań	
Gatunki drewna	
Gęstość drewna	(min. ... średnia ... maks.)
Tempo wzrostu (pierścienie na 10 mm)	(min. ... średnia ... maks.)
Zawartość wilgoci	

Konstrukcje do przeprowadzania badań (*)	Retencja (np. kg/m ³)
Próbka »x« zakonserwowana środkiem do konserwacji	Średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe lub zakres dla 5 próbek
Próbka »y« zakonserwowana środkiem do konserwacji	Średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe lub zakres dla 5 próbek
Próbka »z« zakonserwowana środkiem do konserwacji	Średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe lub zakres dla 5 próbek
Próbki niezakonserwowane	
Zmienność parametrów metody badawczej	np. jakość wody, wymiary próbek do badań itd.
(*) x, y, z reprezentują trzy kontrpróby	

Czas	Wymiana wody	Masa próbki		Absorpcja wody		Próbka wody				
		Próbki zakonserwowane (średnia arytmetyczna)	Próbki niezakonserwowane	Próbki zakonserwowane (średnia arytmetyczna)	Próbki niezakonserwowane		Woda do badań	x	y	z
	Data	g	g	g	g	nr	pH	pH	pH	pH
rozpoczęcie										
6 h						1				
24 h						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

Należy przygotować oddzielne tabele dla każdego składnika aktywnego

Czas	Wymiana wody	Wyniki badania														
		Próbki niezakonserwowane			Próbki zakonserwowane											
		Stężenie składnika aktywnego w wodzie mg/l	Wyemitowana ilość mg/m²	Natężenie emisji mg/m²/d	Stężenie składnika aktywnego w wodzie				Wyemitowana ilość				Natężenie emisji			
	x				y	z	Średnia	x	y	z	Średnia	x	y	z	Średnia	
	Data				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m²	mg/m²	mg/m²	mg/m²	mg/m²/d	mg/m²/d	mg/m²/d	mg/m²/d
6 h																
24 h																
2 d																
4 d																
8 d																
15 d																
22 d																
29 d																

Uwaga: ponieważ może zajść konieczność wykorzystania wyników uzyskanych z próbek niezakonserwowanych do korekty natężeń emisji z próbek zakonserwowanych, wyniki z próbek niekonserwowanych powinny być podane w pierwszej kolejności, zaś wszystkie wartości dla próbek zakonserwowanych stanowiłyby »wartości skorygowane«. Możliwa jest również korekta wstępnej analizy wody.

*Dodatek 2***Definicje**

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna: oznacza dowolną substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej

C.46. BIOAKUMULACJA U BENTOSOWYCH SKĄPOSZCZETÓW ŻYJĄCYCH W OSADZIE**WPROWADZENIE**

1. Opisywana metoda badawcza jest równoważna z wytyczną OECD nr 315 (2008 r.) w sprawie badań dotyczącą narażenia organizmów bentosowych żyjących w osadzie na zawarte w nim substancje (1). Wśród tych organizmów czerpiących pokarm z osadu znajdują się skąposzczety wodne, które odgrywają ważną rolę na dnie systemów wodnych. Żyją one w osadzie i często stanowią najliczniejszy gatunek, w szczególności w siedliskach, w których warunki środowiskowe są niekorzystne dla innych zwierząt. Przyczyniając się do bioturbacji osadu oraz stanowiąc żer dla innych organizmów, zwierzęta te mogą mieć silny wpływ na biodostępność takich substancji dla innych organizmów, np. ryb poszukujących pokarmu w osadzie. W przeciwieństwie do organizmów żyjących na powierzchni osadu, wodne skąposzczety żyjące w osadzie zakopują się w nim i zjadają cząstki osadu znajdujące się pod jego powierzchnią. Z tego powodu, organizmy te są narażone na działanie substancji przez wiele dróg absorpcji, w tym bezpośredni kontakt, zjadanie zanieczyszczonych cząstek osadu, wodę porową i warstwę wody nadosadowej. Niektóre gatunki skąposzczetów bentosowych żyjących w osadzie, wykorzystywane obecnie w badaniach ekotoksykologicznych, opisano w dodatku 6.
2. Parametry, które charakteryzują bioakumulację substancji, obejmują współczynnik bioakumulacji (BAF), stałą szybkości absorpcji osadu (k_s) oraz stałą szybkości eliminacji (k_e). Szczegółowe definicje tych parametrów podano w dodatku 1.
3. Aby dokonać ogólnej oceny potencjału bioakumulacji substancji i zbadać bioakumulację substancji, które zwykle ulegają rozdziałowi w lub na osadach, potrzebna jest metoda badawcza specyficzna dla danego przedziału (1)(2)(3)(4).
4. Niniejsza metoda badawcza została zaprojektowana w celu oceny bioakumulacji substancji związanych z osadem u skąposzczetów żyjących w osadzie. Osad wzbogaca się badaną substancją. Stosowanie wzbogaconego osadu ma na celu symulowanie zanieczyszczonego osadu.
5. Metoda ta opiera się na istniejących metodach badania toksyczności osadu i bioakumulacji (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Inne przydatne dokumenty obejmują dyskusję wyników międzynarodowego warsztatu (11) i wynik międzynarodowego badania międzylaboratoryjnego (12).
6. Badanie to ma zastosowanie do stabilnych, neutralnych substancji organicznych, które na ogół są powiązane z osadami. Niniejsza metoda badawcza może być również stosowana do pomiaru bioakumulacji związanych z osadem, stabilnych związków metaloorganicznych (12). Nie ma ona zastosowania do metali ani innych pierwiastków śladowych (11), jeżeli projekt badania nie zostanie zmodyfikowany pod względem substratu i objętości wody, i ewentualnie wielkości próbki tkanki.

WARUNEK WSTĘPNY I INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI

7. Istnieje tylko kilka ugruntowanych ilościowych zależności struktura-aktywność (QSAR) dotyczących dostępnych obecnie procesów bioakumulacji (14). Najszerzej stosowaną zależnością jest korelacja między odpowiednio bioakumulacją i biokoncentracją stabilnych substancji organicznych oraz ich lipofilnością (wyrażona jako logarytm współczynnika podziału oktanol-woda ($\log K_{ow}$), którego definicja znajduje się w dodatku 1), którą opracowano w celu opisanego rozdziału substancji między wodę i ryby. Zależność ta została również zastosowana do ustalenia korelacji dla osadowego przedziału środowiska wodnego (15)(16)(17)(18). Korelacja $\log K_{ow}$ - $\log BCF$ jako istotna ilościowa zależność struktura-aktywność może być pomocna we wstępnym oszacowaniu potencjału bioakumulacji substancji związanych z osadem. Na BAF może jednak wpływać zawartość lipidów w organizmie użytym do badania i zawartość węgla organicznego w osadzie. W związku z tym współczynnik podziału węgiel organiczny-woda (K_{oc}) można również zastosować jako główną determinantę bioakumulacji substancji organicznych związanych z osadem.
8. Badanie to ma zastosowanie do:
 - stabilnych substancji organicznych o wartościach $\log K_{ow}$ między 3,0 i 6,0 (5)(19) oraz substancji superlipofilowych, które wykazują $\log K_{ow}$ powyżej 6,0 (5);
 - substancji, które należą do klasy substancji organicznych znanych z potencjału bioakumulacji w organizmach żywych, np. substancji powierzchniowo czynnych lub substancji o wysokiej adsorpcyjności (np. o wysokim K_{oc}).

9. Informacje na temat badanej substancji, takie jak środki ostrożności, odpowiednie warunki przechowywania i stabilność oraz metody analityczne należy uzyskać przed rozpoczęciem badania. Wskazówki dotyczące badania substancji o własnościach fizykochemicznych, które utrudniają ich badanie, podano w (20) i (21). Przed rozpoczęciem badania bioakumulacji u skąposzczetów wodnych należy uzyskać następujące informacje o substancji badanej:
- nazwa zwyczajowa, nazwa systematyczna (najlepiej wg nomenklatury IUPAC), wzór strukturalny, numer CAS, czystość;
 - rozpuszczalność w wodzie metoda badawcza A.6 (22) ;
 - współczynnik podziału oktanol/woda, K_{ow} [metody badawcze A.8, A.24 (22)];
 - współczynnik podziału osad-woda, wyrażony jako K_d lub K_{oc} [metoda badawcza C19 (22)];
 - hydroliza [metoda badawcza C.7] (22);
 - fototransformacja w wodzie (23);
 - prężność par [metoda badawcza A.4 (22)];
 - szybka biodegradowalność [metody badawcze C.4 i C.29 (22)];
 - napięcie powierzchniowe [metoda badawcza A.5 (22)];
 - krytyczne stężenie micelizacji (24).
- Ponadto istotne mogą być następujące informacje, jeżeli są dostępne:
- biodegradacja w środowisku wodnym [metody badawcze C.24 i C.25 (22)];
 - stała Henry'ego.
10. Oznakowane izotopowo substancje badane ułatwiają analizę wody, osadu i próbek biologicznych i mogą być wykorzystane do określenia, czy należy dokonywać identyfikacji i oznaczania ilościowego produktów degradacji. Opisaną tu metodą została zweryfikowana w ramach międzynarodowego badania międzylaboratoryjnego (12) substancji znakowanych ^{14}C . Jeżeli mierzy się całkowitą ilość pozostałości radioaktywnych, współczynnik bioakumulacji (BAF) opiera się na substancji macierzystej, wraz ze wszystkimi zachowanymi produktami degradacji. Można również połączyć badanie metabolizmu z badaniem bioakumulacji, wykonując analizę i oznaczenie ilościowe procentowej zawartości substancji macierzystej i produktów jej degradacji w próbkach pobranych na końcu fazy absorpcji lub w szczytowym momencie bioakumulacji. W każdym razie zaleca się, aby obliczać współczynnik bioakumulacji na podstawie stężenia macierzystej substancji w organizmach, a nie tylko całkowitych pozostałości radioaktywnych.
11. Inne wymagane informacje oprócz właściwości badanej substancji to toksyczność substancji dla gatunków skąposzczetów wodnych do badań, takie jak mediana stężenia śmiertelnego (LC_{50}) w odniesieniu do czasu niezbędnego dla fazy absorpcji, aby upewnić się, czy wybrane stężenia ekspozycji są znacznie poniżej poziomów toksycznych. Preferowanymi wartościami dotyczącymi toksyczności są wartości pozyskane z długoterminowych badań nad subletalnymi punktami końcowymi (EC_{50}), jeśli takie dane są dostępne. Jeśli jednak nie są dostępne, pomocnych informacji może dostarczyć badanie ostrej toksyczności w warunkach identycznych z warunkami badania bioakumulacji lub dane dotyczące toksyczności dla innych gatunków zastępczych.
12. Powinna istnieć odpowiednia metoda analityczna o znanej dokładności, precyzji oraz czułości w celu oznaczenia ilościowego substancji w roztworach do badań, w osadzie oraz w materiale biologicznym wraz ze szczegółowymi informacjami na temat przygotowania i przechowywania próbek oraz kartami charakterystyki bezpieczeństwa materiałów. Znane powinny być także analityczne granice wykrywalności badanej substancji w wodzie, osadzie i tkance organizmów. Jeśli stosuje się badaną substancję oznakowaną izotopowo, powinna być znana promieniotwórczość właściwa (np. $Bq\ mol^{-1}$), pozycja oznakowanego izotopowo atomu i odsetek promieniotwórczości związany z zanieczyszczeniami. Promieniotwórczość właściwa badanej substancji powinna być jak najwyższa, aby można było wykrywać jak najniższe badane stężenia (11).
13. Powinny być dostępne informacje na temat cech charakterystycznych zastosowanego osadu (np. pochodzenie osadu lub jego składników, pH i stężenie amoniaku w wodzie porowej (osady pobrane w terenie), zawartość węgla organicznego, rozkład wielkości cząstek (procent piasku, mułu i gliny) i procent suchej masy) (6).

ZASADA BADANIA

14. Badanie składa się z dwóch etapów: etapu absorpcji (narażenia) i etapu eliminacji (po narażeniu). Podczas etapu absorpcji organizmy zostają narażone przez kontakt z osadem, który wzbogacono badaną substancją, uzupełniono wodą regenerowaną i w razie potrzeby odstawiono do stabilizacji (11). Grupy organizmów kontrolnych przetrzymuje się w identycznych warunkach bez badanej substancji.
15. Na potrzeby etapu eliminacji organizmy przenosi się do układu osad-woda niezawierającego badanej substancji. Etap eliminacji jest niezbędny dla uzyskania informacji na temat tempa, w jakim badana substancja jest wydalana przez organizmy użyte do badań (19)(25). Etap eliminacji jest zawsze wymagany, chyba że absorpcja badanej substancji podczas etapu narażenia nie była znacząca (np. nie ma statystycznej różnicy między stężeniem badanej substancji w organizmach użytych do badania i kontrolnych). Jeśli podczas etapu absorpcji nie osiągnięto stanu ustalonego, w oparciu o wyniki uzyskane na etapie eliminacji można określić kinetykę – kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAF_k), stałą lub stałe tempa absorpcji i eliminacji. Stężenie badanej substancji w/na organizmach monitoruje się w trakcie obydwu etapów badania.
16. Podczas etapu absorpcji pomiarów dokonuje się do momentu, w którym współczynnik bioakumulacji osiągnie stan równowagi, czyli stan ustalony. Standardowo czas trwania etapu absorpcji powinien wynosić 28 dni. Doświadczenie praktyczne wykazało, że etap absorpcji trwający 12–14 dni jest wystarczający do osiągnięcia stanu ustalonego przez szereg stałych, neutralnych substancji organicznych (6)(8)(9).
17. Jeżeli jednak stan ustalony nie zostanie osiągnięty w ciągu 28 dni, etap eliminacji zaczyna się od przeniesienia skąposzczetów narażonych na działanie substancji do naczyń zawierających to samo środowisko bez badanej substancji. Etap eliminacji kończy się albo gdy stężenie zmierzone u organizmów osiągnie 10 % poziomu stężenia zmierzonego 28. dnia etapu absorpcji, albo po upływie maksymalnego okresu 10 dni. Poziom pozostałości u organizmów pod koniec etapu eliminacji przedstawia się w sprawozdaniu jako dodatkowy punkt końcowy, np. niewyeliminowane pozostałości. Współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym (BAF_{ss}) należy obliczać jako stosunek stężenia w organizmach (C_a) i w osadzie (C_s) przy ewidentnym stanie ustalonym i jako kinetyczny współczynnik bioakumulacji BAF_k , czyli stosunek stałej tempa absorpcji z osadu (k_a) oraz stałej tempa eliminacji (k_e) przy założeniu kinetyki reakcji pierwszego rzędu. Jeżeli stan ustalony nie zostanie osiągnięty w ciągu 28 dni, należy obliczyć BAF_k na podstawie stałych tempa absorpcji i tempa eliminacji. Obliczenia zamieszczono w dodatku 2. Jeśli kinetyka reakcji pierwszego rzędu nie ma zastosowania, należy zastosować inne modele (dodatek 2 i pozycja bibliografii (25)).
18. Jeżeli stan ustalony nie zostanie osiągnięty w ciągu 28 dni, etap absorpcji można przedłużyć, poddając grupy organizmów narażonych na działanie substancji – jeżeli są dostępne – dalszym pomiarom do momentu osiągnięcia stanu ustalonego; równolegle należy jednak rozpocząć etap eliminacji w 28. dniu etapu absorpcji.
19. Stałą tempa absorpcji, stałą tempa eliminacji (lub stałe, jeśli zastosowano bardziej złożone modele), kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAF_k) oraz, jeśli to możliwe, granice ufności każdego z tych parametrów oblicza się za pomocą komputerowych modeli równań (zob. dodatek 2 dotyczący modeli). Odpowiedniość dopasowania modelu można określić na podstawie współczynnika korelacji lub współczynnika determinacji (współczynniki o wartościach zbliżonych do 1 wskazują na dobre dopasowanie).
20. Aby zmniejszyć zróżnicowanie wyników badania w odniesieniu do substancji organicznych o wysokim poziomie lipofilności, współczynniki bioakumulacji należy dodatkowo wyrazić w odniesieniu do zawartości lipidów w organizmach użytych do badania oraz do węgla organicznego (TOC) w osadzie (współczynnik bioakumulacji organizmy żywe-osad (BASF) w kg całkowitego węgla organicznego w osadzie na kg^{-1} zawartości lipidów w organizmach). Takie podejście jest oparte na doświadczeniach i teoretycznych zależnościach dla przedziału wodnego, w przypadku którego – w odniesieniu do niektórych klas substancji chemicznych – istnieje wyraźne powiązanie między zdolnością do bioakumulacji a lipofilnością, co zostało dobrze udowodnione w odniesieniu do ryb jako organizmów modelowych (14)(25)(27). Istnieje również związek między zawartością lipidów w badanych rybach a bioakumulacją takich substancji. W przypadku organizmów żyjących w osadzie stwierdzono podobne korelacje (15)(16)(17)(18). Jeśli dostępna jest wystarczająca ilość tkanek organizmów, zawartość lipidów w zwierzętach użytych do badania można określić z wykorzystaniem tego samego materiału biologicznego, który wykorzystano do określenia stężenia badanej substancji. Praktyczne jest wykorzystywanie zaaklimatyzowanych zwierząt z próby kontrolnej, przynajmniej na początku, lub – najlepiej – na końcu etapu absorpcji, w celu zmierzenia zawartości lipidów, która może następnie zostać wykorzystana do normalizowania wartości współczynnika bioakumulacji.

WAŻNOŚĆ BADANIA

21. Aby badanie było ważne, zastosowanie mają następujące warunki:
- łączna śmiertelność organizmów (w próbach kontrolnych i poddanych działaniu substancji) na koniec badania nie powinna przekraczać 20 % początkowej liczby.
 - ponadto należy wykazać, że organizmy zakopują się w osadzie, co umożliwia maksymalne narażenie. Szczegółowe informacje podano w pkt 28.

OPIS METODY**Badane gatunki**

22. W badaniu można wykorzystać kilka gatunków skąposzczetów wodnych. Najczęściej wykorzystywane gatunki wymieniono w dodatku 6.
23. Badania toksyczności (96 h, tylko w wodzie) należy wykonywać w regularnych odstępach czasu (np. co miesiąc), stosując toksyczną substancję odniesienia, taką jak chlorek potasu (KCl) lub siarczan miedzi (CuSO_4), w celu wykazania stanu zdrowia zwierząt użytych do badania (1)(6). Jeżeli nie przeprowadza się referencyjnych badań toksyczności w regularnych odstępach czasu (np. co miesiąc), partię organizmów, które mają być wykorzystane w badaniu bioakumulacji osadu, należy sprawdzać z użyciem toksycznej substancji odniesienia. Pomiar zawartości lipidów może również dostarczyć przydatnych informacji na temat stanu zwierząt.

Hodowla organizmów użytych do badania

24. Aby zapewnić wystarczającą liczbę organizmów do wykonania badań bioakumulacji, może być konieczne przetrzymywanie ich w stałej hodowli laboratoryjnej jednego gatunku. Metody dotyczące hodowli laboratoryjnej wybranych gatunków przedstawiono w dodatku 6. Szczegółowe informacje zob. pozycje bibliografii (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Aparatura

25. Należy dołożyć starań, aby w odniesieniu do wszystkich części sprzętu unikać stosowania materiałów, które mogą spowodować rozpuszczenie, wchłonięcie lub wypłukanie badanych substancji lub innych substancji i mają niekorzystny wpływ na zwierzęta użyte do badań. Można zastosować standardowe prostokątne lub cylindryczne naczynia, wykonane z chemicznie obojętnego materiału i posiadające odpowiednią pojemność, zgodnie ze wskaźnikiem obciążenia, tj. liczbą organizmów, jaką można wykorzystać w badaniu. Należy unikać stosowania rur z miękkiego tworzywa sztucznego do doprowadzania wody lub powietrza. Sprzęt mający kontakt z badanymi podłożami może być wykonany z politetrafluoroetyleny, ze stali nierdzewnej lub szkła. W przypadku substancji o wysokich współczynnikach adsorpcji, takich jak syntetyczne pyretroidy, konieczne może być zastosowanie szkła silanizowanego. W takich sytuacjach sprzęt po użyciu należy wyrzucić (5). W przypadku oznakowanych izotopowo substancji badanych i w przypadku substancji lotnych należy zachować ostrożność w celu uniknięcia odpędzenia i ucieczki odpędzanej substancji badanej. Należy zastosować pułapki (np. szklane płuczki gazowe) zawierające odpowiednie absorbenty zatrzymujące wszelkie pozostałości odprowadzające z komór badawczych (11).

Woda

26. Warstwa wody nadosadowej powinna mieć jakość, która pozwoli na przetrwanie badanych gatunków przez okres trwania aklimatyzacji i okres badań oraz nie będzie powodowała pojawienia się u ich nietypowego wyglądu lub zachowania. Zgodnie z metodą badania C.1 (25), jako wodę nadosadową w badaniach oraz hodowlach laboratoryjnych organizmów zaleca się stosować wodę regenerowaną. Wykazano, że w takiej wodzie przeżyć, rozwijać się i rozmnażać może kilka gatunków badanych (8), a także zapewnia się w ten sposób maksymalną standaryzację warunków badania i hodowli. Wodę należy scharakteryzować przynajmniej pod względem pH, przewodności właściwej i twardości. Użytecznych informacji powinna dostarczyć także analiza wody pod kątem mikrozanieczyszczeń przeprowadzona przed zastosowaniem (dodatek 4).
27. W czasie badania jakość wody powinna być stała. pH wody nadosadowej powinno wynosić 6–9. Na początku badania całkowita twardość powinna wynosić 90–400 mg CaCO_3 na litr (7). Zakresy pH i twardości wspomnianej wody regenerowanej podano w metodzie badania C.1 (25). Jeśli jednak zachodzi podejrzenie, że między jonami powodującymi twardość wody a substancją badaną dochodzi do interakcji, powinna być stosowana woda o mniejszej twardości. W dodatku 4 zestawiono dodatkowe kryteria dla wody nadającej się do rozcieńczania według wytycznej OECD nr 210 w sprawie badań (34).

Osad

28. Osad powinien być takiej jakości, która pozwoli na przeżycie, a także rozmnażanie się organizmów użytych do badania w okresie aklimatyzacji i badanych okresów, przy czym organizmy nie powinny charakteryzować się nietypowym wyglądem ani zachowaniem. Organizmy powinny zakopywać się w osadzie. Zakopywanie się może mieć wpływ na narażenie i w związku z tym na BAF. W związku z tym unikanie osadu i zachowania organizmów użytych do badania związane z zakopywaniem się w glebie należy obserwować i odnotowywać, jeżeli mętność warstwy wody nadosadowej umożliwia takie obserwacje. Organizmy (kontrolne i poddane działaniu substancji) powinny zakopać się w osadzie w ciągu 24 h po dodaniu do naczyń badawczych. Jeżeli zaobserwuje się, że organizmy nie zakopują się w osadzie lub unikają osadu (np. ponad 20 % organizmów przez ponad połowę etapu absorpcji), oznacza to, że warunki badania nie są odpowiednie lub organizmy użyte do badań nie są zdrowe, lub że zachowanie to jest wywoływane przez stężenie badanej substancji. W takim przypadku badanie należy przerwać i powtórzyć w poprawionych warunkach. Dodatkowe informacje na temat zjadania osadu można uzyskać stosując metody opisane w (35)(36), które określają zjadanie osadu lub wybór cząstek u organizmów użytych do badania. Jeżeli możliwe jest zaobserwowanie na powierzchni osadu co najmniej obecności lub braku obecności granulek odchodów, które wskazują na zjadanie osadu przez organizmy, należy to odnotować i uwzględnić w interpretacji wyników badania w związku z drogami narażenia.
29. W tym badaniu i w hodowlach laboratoryjnych organizmów zaleca się wykorzystanie sztucznego osadu opartego na sztucznej glebie opisanej w metodzie badawczej C.8 (40) (dodatek 5), ponieważ naturalne osady o właściwej jakości mogą nie być dostępne przez cały rok. Dodatkowo na badanie mogą mieć wpływ organizmy rodzime oraz obecność mikrozanieczyszczeń w naturalnym osadzie. W sztucznym osadzie przeżyć, rozwijać się i rozmnażać może szereg badanych gatunków (8).
30. Sztuczny osad należy scharakteryzować przynajmniej pod względem pochodzenia składników, rozkładu wielkości ziaren (procent piasku, mułu i gliny), zawartości węgla organicznego (TOC), zawartości wody i pH. Pomiar potencjału redoks jest nieobowiązkowy. Naturalne osady z niezanieczyszczonych miejsc mogą jednak również posłużyć jako osad badany lub jako osad do hodowli (1). Osady naturalne należy scharakteryzować, podając co najmniej ich pochodzenie (miejsce zebrania), pH i zawartość amoniaku w wodzie porowej, zawartość węgla organicznego (TOC), rozkład wielkości ziaren (procent piasku, łu i gliny) oraz procentową zawartość wilgoci (6). Zaleca się także, aby przed wzbogaceniem badaną substancją naturalny osad był przez siedem dni kondycjonowany w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania, jeżeli przewiduje się powstawanie amoniaku. Na koniec okresu kondycjonowania należy usunąć i odrzucić wodę nadosadową. Użytecznych informacji powinna dostarczyć także analiza osadu lub jego składników pod kątem mikrozanieczyszczeń przeprowadzona przed zastosowaniem.

Przygotowanie

31. Postępowanie z naturalnymi osadami przed ich zastosowaniem w laboratorium opisano w (1)(6)(44). W dodatku 5 podano sposób przygotowania sztucznego osadu.

Przechowywanie

32. W przypadku osadów naturalnych okres ich przechowywania w laboratorium powinien być możliwie jak najkrótszy. U.S. EPA (6) zaleca, aby maksymalny okres przechowywania wynosił 8 tygodni i aby przechowywać osad bez dostępu światła w temperaturze 4 ± 2 °C. W pojemnikach do przechowywania nie powinno być żadnej fazy gazowej nad osadem. Zalecenia dotyczące przygotowania sztucznego osadu podano w dodatku 5.

Stosowanie substancji badanej

33. Osad wzbogaca się badaną substancją. Procedura wzbogacania obejmuje pokrycie badaną substancją jednego lub większej liczby składników osadu. Na przykład piasek kwarcowy lub jego część (np. 10 g piasku kwarcowego na naczynie badawcze) można namoczyć w roztworze badanej substancji w odpowiednim rozpuszczalniku, który następnie powoli odparuje do sucha. Taką powleczoną frakcję można następnie wymieszać z mokrym osadem. Należy mieć na uwadze, że przygotowując osad należy uwzględnić piasek zawarty w mieszaninie substancji badanej z piaskiem, tj. osad należy przygotować z mniejszą ilością piasku (6).

34. W przypadku zastosowania osadu naturalnego badaną substancję można dodać, wzbogacając wysuszoną na powietrzu część osadu, zgodnie z opisem dotyczącym sztucznego osadu powyżej, lub mieszając badaną substancję z mokrym osadem, następnie odparowując ewentualnie zastosowany środek rozpuszczający. Rozpuszczalniki nadające się do wzbogacania mokrego osadu to etanol, metanol, eter monometylowy glikolu etylenowego, eter dimetylenowy glikolu etylenowego, dimetyloformamid i glikol trietylenowy (5)(34). Toksyczność i lotność rozpuszczalnika oraz rozpuszczalność badanej substancji w wybranym rozpuszczalniku powinny być głównymi kryteriami branymi pod uwagę przy wyborze odpowiedniego środka rozpuszczającego. Dodatkowe wytyczne dotyczące procedur wzbogacania podano w Environment Canada (1995)(41). Należy dopilnować, by substancja badana dodana do osadu została w nim dokładnie i równo rozprowadzona. Stanowiące kontrpróbki podpróbki wzbogaconego osadu należy poddać analizie w celu sprawdzenia stężeń badanej substancji w osadzie i oznaczenia stopnia jednorodności rozprowadzenia substancji.
35. Po przygotowaniu wzbogaconego osadu z warstwą wody nadosadowej należy umożliwić rozdzielanie substancji badanej między fazę wodną i osad. W miarę możliwości powinno się to odbywać w takich samych warunkach temperatury i napowietrzenia, jakie zastosowano na potrzeby badania. Okres ustalania stanu równowagi zależy od osadu i substancji i może być rzędu kilku godzin lub kilku dni, a w rzadkich przypadkach trwać do kilku tygodni (4–5 tygodni) (28)(42). W tym badaniu nie oczekuje się stanu równowagi, ale zaleca się stosowanie okresu ustalania równowagi trwającego od 48 godzin do 7 dni. W zależności od celu badania, na przykład, jeśli dąży się do odtworzenia warunków środowiskowych, wzbogacony osad może być »postarzany« przez dłuższy okres (11).

WYKONANIE BADANIA

Badanie wstępne

36. Może być ono przydatne dla wykonania wstępnego doświadczenia w celu zoptymalizowania warunków badania ostatecznego, np. jeżeli chodzi o wybór stężenia (stężeń) substancji i czas trwania fazy absorpcji i eliminacji. Zachowanie organizmów, na przykład unikanie osadu, tj. organizmy uciekają od osadu, co może być spowodowane przez badaną substancję lub sam osad, należy obserwować i odnotowywać w trakcie badania wstępnego. Unikanie osadu można również zastosować jako parametr subletalny w badaniu wstępnym w celu oszacowania stężeń badanej substancji, które mają być zastosowane w badaniu bioakumulacji.

Warunki narażenia

Czas trwania etapu absorpcji

37. Na etapie absorpcji organizmy użyte do badań są narażone na działanie badanej substancji. Pierwszą próbkę należy pobrać po 4–24 godzinach po rozpoczęciu etapu absorpcji. Etap absorpcji powinien trwać 28 dni (1)(6) (11), chyba że można udowodnić, że równowagę osiągnięto wcześniej. Stan ustalony ma miejsce wówczas, gdy: (i) wykres współczynników bioakumulacji w każdym okresie pobierania próbek w funkcji czasu jest równoległy do osi czasu, (ii) trzy następujące po sobie analizy współczynnika stężenia wykonane na próbkach pobranych w odstępach co najmniej dwóch dni nie różnią się od siebie więcej niż o $\pm 20\%$, (iii) nie ma istotnych różnic między trzema okresami pobierania próbek (na podstawie porównań statystycznych, np. analizy wariancji i analizy regresji). Jeżeli stan ustalony nie został osiągnięty w ciągu 28 dni, etap absorpcji można zakończyć, rozpoczynając etap eliminacji, a BAF_k można obliczyć na podstawie stałych tempa absorpcji i eliminacji (zob. również pkt 16–18).

Czas trwania etapu eliminacji

38. Pierwszą próbkę należy pobrać po 4–24 godzinach od rozpoczęcia etapu eliminacji, ponieważ w okresie wstępnym mogą zachodzić gwałtowne zmiany w pozostałościach w tkankach. Zaleca się zakończyć etap eliminacji, gdy stężenie badanej substancji wynosi mniej niż 10 % stężenia w stanie ustalonym albo po maksymalnym czasie trwania wynoszącym 10 dni. Poziom pozostałości w organizmach pod koniec etapu eliminacji podaje się w sprawozdaniu jako drugorzędny punkt końcowy. Okres ten może jednak zależeć od okresu, przez który stężenie badanej substancji u organizmów pozostaje powyżej analitycznych granic wykrywalności.

Organizmy użyte do badań

Liczby badanych organizmów

39. Liczba organizmów w próbce musi zapewnić taką masę tkanki organizmów, aby masa badanej substancji w próbce odpowiednio na początku etapu absorpcji i na końcu etapu eliminacji była znacząco wyższa niż granica wykrywalności badanej substancji w materiale biologicznym. Na wspomnianych etapach absorpcji i eliminacji stężenie u zwierząt użytych do badania jest zazwyczaj stosunkowo niskie (6)(8)(18). W związku z tym, że masa ciała pojedynczych osobników u wielu gatunków wodnych skąposzczetów jest bardzo niska (5–10 mg mokrej masy na osobnika w przypadku *Lumbriculus variegatus* i *Tubifex tubifex*), organizmy z danej komory badawczej stanowiącej kontrpróbę można połączyć w celu zważenia i wykonania analizy badanej substancji chemicznej. W przypadku badanych gatunków o wyższej masie pojedynczych osobników (np. *Branchiura sowerbyi*) można wykorzystywać kontrpróby zawierające jednego osobnika, jednak w takich przypadkach liczba kontrprób powinna zostać zwiększona do pięciu na punkt pobierania próbek (11). Należy jednak zauważyć, że *B. sowerbyi* nie został uwzględniony w badaniu międzylaboratoryjnym (12) i w związku z tym nie zaleca się wykorzystywania go jako gatunku preferowanego w tej metodzie.
40. Należy wykorzystywać organizmy o podobnej wielkości (w przypadku *L. variegatus* zob. dodatek 6). Powinny one pochodzić z tego samego źródła, a także powinny być dorosłymi lub dużymi zwierzętami należącymi do tej samej grupy wiekowej (zob. dodatek 6). W związku z tym, że masa i wiek zwierzęcia mogą mieć istotny wpływ na wartości współczynnika bioakumulacji (np. z powodu różnej zawartości lipidów lub obecności jaj), te parametry należy dokładnie zanotować. Zaleca się zważenie podpróbki organizmów przed rozpoczęciem badania w celu oszacowania ich średniej mokrej i suchej masy.
41. W przypadku *Tubifex tubifex* i *Lumbriculus variegatus* można spodziewać się, że będą się rozmnażać w czasie badania. Brak rozmnażania w badaniu bioakumulacji należy odnotować i uwzględnić podczas interpretacji wyników badania.

Obciążenie

42. Należy zastosować wysoki stosunek osadu do organizmów i wody do organizmów, aby ograniczyć do minimum spadek stężenia badanej substancji w osadzie na etapie absorpcji i uniknąć spadków stężenia rozpuszczonego tlenu. Wybrany wskaźnik obciążenia powinien również odpowiadać naturalnie występującym zagęszczeniom populacji wybranych gatunków (43). Na przykład dla *Tubifex tubifex* zaleca się, aby wskaźnik obciążenia wynosił 1–4 mg tkanki organizmów (mokra masa) na gram mokrego osadu (8)(11). W pozycjach bibliografii (1) i (6) w przypadku *L. variegatus* zaleca się poziom obciążenia ≤ 1 g suchej masy tkanki organizmów na 50 g węgla organicznego w osadzie.
43. Organizmy, które mają być użyte w badaniu, usuwa się z hodowli przesiewając osad hodowli. Zwierzęta (dorosłe lub duże organizmy bez oznak niedawnej fragmentacji) zostają przeniesione do szklanych naczyń (np. na płytki Petriego) zawierających czystą wodę. Jeśli warunki badania różnią się od warunków hodowli, etap aklimatyzacji trwający 24 godziny powinien być wystarczający. Przed ważeniem należy usunąć z organizmów nadmiar wody. Można to zrobić, delikatnie umieszczając organizmy na wstępnie nawilżonej bibule. Do osuszania organizmów nie zaleca się stosowania papieru chłonnego, ponieważ może to narazić je na stres lub uszkodzenie. Brunson i in. (1998) zalecali wykorzystywanie nieosuszonych organizmów o masie stanowiącej około 1.33-krotności biomasy docelowej. Te dodatkowe 33 % odpowiada różnicy między osuszonymi i nieosuszonymi organizmami (28).
44. Na początku etapu absorpcji (dzień 0 badania) organizmy użyte do badań wyjmują się z komory aklimatyzacyjnej i rozmieszcza losowo w naczyniach (np. na płytkach Petriego) zawierających wodę regenerowaną, dodając do każdego naczynia po dwa organizmy, dopóki w każdym naczyniu nie znajdzie się dziesięć organizmów. Każdą z tych grup organizmów następnie przenosi się losowo do oddzielnych naczyń, np. za pomocą delikatnej stalowej pęsety. Naczynia badawcze następnie inkubuje się w warunkach badania.

Karmienie

45. W związku z niską zawartością składników odżywczych w sztucznym osadzie należy zmodyfikować osad, dodając do niego źródło pokarmu. Aby uniknąć niedoszacowania narażenia organizmów użytych do badania, np. na skutek wybiórczego żerowania na niezanieczyszczonym pokarmie, pokarm niezbędny do rozmnażania i wzrostu organizmów użytych do badania należy dodać do osadu jednorazowo przed dodaniem lub podczas dodawania badanej substancji (zob. dodatek 5).

Stosunek osad-woda

46. Zalecany stosunek osad-woda wynosi 1:4 (45). Stosunek ten uznaje się za właściwy do utrzymania stężenia tlenu na właściwych poziomach i uniknięcia odkładania się amoniaku w wodzie nadosadowej. Zawartość tlenu w wodzie nadosadowej należy utrzymać na poziomie ≥ 40 % nasycenia. Woda nadosadowa w naczyniu badawczym powinna być delikatnie napowietrzana (np. 2–4 pęcherzyki powietrza na sekundę) przez pipetę Pasteura, której koniec znajduje się około 2 cm nad powierzchnią osadu w celu zminimalizowania zakłóceń osadu.

Światło i temperatura

47. Fotoperiod w hodowli i w badaniu wynosi 16 godzin (1)(6). Natężenie światła w obszarze badania należy utrzymywać na poziomie około 500–1 000 lx. Temperatura powinna wynosić 20 ± 2 °C przez cały czas trwania badania.

Badane stężenia

48. Jedno badane stężenie (jak najniższe) wykorzystuje się do oznaczenia kinetyki absorpcji, można jednak wykorzystać drugie (wyższe) stężenie (np. (46)). W takim przypadku próbki pobiera się i analizuje w stanie ustalonym lub po 28 dniach w celu potwierdzenia współczynnika bioakumulacji zmierzonego przy niższym stężeniu (11). Należy wybrać wyższe stężenie, aby można było wykluczyć szkodliwe skutki (np. wybierając ok. 1 % najniższego znanego stężenia, przy którym obserwuje się przewlekłe zmiany EC_{xx} , przyjętego z badań przewlekłej toksyczności). Niższe badane stężenie powinno być znacznie wyższe niż granica wykrywalności w próbkach osadu i próbkach biologicznych z zastosowaniem metody analitycznej. Jeśli stężenie badanej substancji powodujące zmiany jest zbliżone do analitycznej granicy wykrywalności, zaleca się stosowanie badanej substancji oznakowanej izotopowo z wysokim poziomem promieniotwórczości właściwej.

Kontrpróby poddane działaniu substancji i kontrpróby kontrolne

49. Minimalna liczba kontrprób poddanych działaniu substancji na potrzeby pomiarów kinetycznych na etapach absorpcji i eliminacji powinna wynosić trzy na jeden punkt pobierania próbek (11). Należy wykorzystać dodatkowe kontrpróby, np. na potrzeby nieobowiązkowych dodatkowych dni pobierania próbek. W odniesieniu do etapu eliminacji przygotowuje się dopasowaną liczbę kontrprób z niewzbogaconym osadem i wodą nadosadową, aby pod koniec etapu absorpcji organizmy poddane działaniu substancji można było przenieść z oznaczonych naczyń z substancją do naczyń bez substancji. Całkowita liczba kontrprób poddanych działaniu substancji powinna być wystarczająca na potrzeby etapów absorpcji i eliminacji.
50. Ewentualnie organizmy wyznaczone do pobrania próbki podczas etapu eliminacji można poddać działaniu substancji w jednym dużym pojemniku, zawierającym wzbogacony osad z tej samej partii, którą wykorzystano do kinetyki absorpcji. Należy wykazać, że warunki badania (np. głębokość osadu, stosunek osad-woda, obciążenie, temperatura, jakość wody) są porównywalne z kontrpróbkami wyznaczonymi do etapu absorpcji. Na zakończenie etapu absorpcji woda, osad i próbki organizmów należy pobrać z tego pojemnika do analizy, a wystarczającą liczbę dużych organizmów, które nie wykazują oznak niedawnej fragmentacji, należy ostrożnie wyjąć i przenieść do kontrprób przygotowanych do etapu eliminacji (np. po dziesięć organizmów na naczynie z kontrpróbą).
51. Jeżeli nie zastosowano żadnego innego rozpuszczalnika niż woda, należy zapewnić co najmniej 9 kontrprób ujemnej próby kontrolnej (co najmniej 3 pobrane na początku, 3 pobrane na końcu absorpcji i 3 pobrane na końcu eliminacji) w celu analizy biologicznej i analizy tła. Jeśli do zastosowania badanej substancji wykorzystano środek rozpuszczający, należy wykonać próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem (co najmniej 3 kontrpróby należy pobrać na początku i 3 na końcu etapu absorpcji oraz 3 na końcu etapu eliminacji). W takim przypadku należy zapewnić także cztery kontrpróby ujemnej próby kontrolnej (bez rozpuszczalnika) na potrzeby pobierania próbek na koniec etapu absorpcji. Takie kontrpróby można porównać pod kątem parametrów biologicznych z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem w celu uzyskania informacji na temat ewentualnego wpływu rozpuszczalnika na organizmy użyte do badań. Szczegóły podano w dodatku 3.

Częstotliwość pomiarów jakości wody

52. Na etapach absorpcji i eliminacji należy wykonać pomiary co najmniej następujących parametrów jakości wody w warstwie wody nadosadowej:

Temperatura	w jednym naczyniu na każdy poziom narażenia w dniach pobierania próbek i w jednym naczyniu kontrolnym raz na tydzień oraz na początku i na końcu okresu absorpcji i eliminacji; można również odnotować temperaturę otaczającego środowiska (powietrze atmosferyczne lub łaźnia wodna) lub w jednym reprezentatywnym naczyniu badawczym, np. w sposób ciągły lub co godzinę;
Zawartość rozpuszczonego tlenu	w jednym naczyniu na każdy poziom narażenia i w jednym naczyniu kontrolnym w dniach pobrania próbek; wyrażona w mg/L i % ASV (wartości nasycenia powietrzem);
Doprowadzenie powietrza	kontrolowane co najmniej raz dziennie (w dni robocze) i w razie potrzeby korygowane;
pH	w jednym naczyniu na każdy poziom narażenia w dniach pobierania próbek i w jednym naczyniu kontrolnym raz na tydzień oraz na początku i na końcu okresu absorpcji i eliminacji;
Całkowita twardość wody	co najmniej w jednym naczyniu poddanym narażeniu i w jednym naczyniu kontrolnym na początku i na końcu okresu absorpcji i eliminacji, wyrażona w mg/l CaCO_3 ;
Całkowita zawartość amoniaku	co najmniej w jednym naczyniu poddanym narażeniu i w jednym naczyniu kontrolnym na początku i na końcu okresu absorpcji i eliminacji, wyrażona w mg/l NH_4^+ lub NH_3 lub jako amoniak całkowity.

Pobieranie próbek oraz analiza organizmów, osadu i wody

Harmonogram pobierania próbek

53. Przykłady harmonogramów pobierania próbek, dla etapu absorpcji trwającego 28 dni i etapu eliminacji trwającego 10 dni, przedstawiono w dodatku 3.
54. Pobrać próbki wody i osadu z komór badawczych w celu określenia stężenia badanej substancji przed dodaniem organizmów oraz na etapie absorpcji i etapie eliminacji. Podczas badania oznacza się stężenia substancji badanej w organizmach, osadzie i wodzie w celu monitorowania rozmieszczenia badanej substancji w przedziałach układu badawczego.
55. Próbki organizmów, osadu i wody należy pobrać co najmniej sześć razy na etapie absorpcji i eliminacji.
56. Kontynuować pobieranie próbek do momentu osiągnięcia stanu równowagi (stanu ustalonego) (zob. dodatek 1) lub przez 28 dni. Jeżeli stan równowagi nie zostanie osiągnięty przez 28 dni, należy rozpocząć etap eliminacji. Rozpoczynając etap eliminacji, przenieść oznaczone organizmy do stanowiących kontrpróby komór zawierających osad i wodę nie poddane działaniu substancji (zob. pkt 17 i 18).

Pobieranie i przygotowywanie próbek

57. Pobrać próbki wody, dekantując, syfonując lub pobierając pipetą objętość wystarczającą do zmierzenia ilości badanej substancji w próbce.
58. Pozostałą wodę nadosadową ostrożnie dekantuje się lub usuwa przez syfon z komory lub komór badawczych. Próbki osadu należy pobierać ostrożnie, tak aby w jak najmniejszym stopniu zakłócić spokój organizmów.
59. Wyjąć wszystkie organizmy z badanej kontrpróby w czasie pobierania próbek, np. zawieszając osad w warstwie wody nadosadowej i rozprowadzając zawartość każdej kontrpróby na płytce tacy i wybierając organizmy za pomocą delikatnych stalowych szczypczyków. Opłukać je szybko wodą na płytce szklanej lub stalowej tacy. Usunąć nadmiar wody. Następnie ostrożnie przenieść organizmy do zważonego uprzednio naczynia i zważyć je. Uśmiercić organizmy przez zamrożenie (np. w temperaturze $\leq -18^\circ\text{C}$). Należy zanotować obecność i liczbę kokonów lub młodych osobników.

60. Zasadniczo organizmy należy ważyć i uśmiercać natychmiast po pobraniu próbki z pominięciem etapu opróżniania przewodu pokarmowego w celu otrzymania konserwatywnego współczynnika bioakumulacji, który obejmuje zanieczyszczoną zawartość układu pokarmowego, i w celu uniknięcia strat pozostałości w ciele na etapie opróżniania przewodu pokarmowego w samej wodzie (8). Nie oczekuje się istotnego wyeliminowania substancji o wartości $\log K_{ow}$ powyżej 5 na którymkolwiek etapie opróżniania przewodu pokarmowego w samej wodzie, chociaż substancje o wartości $\log K_{ow}$ niższej niż 4 mogą być tracone w znacznych ilościach (47).
61. Na etapie eliminacji organizmy wypróżniają się do czystego osadu. Oznacza to, że pomiary wykonane bezpośrednio przed etapem eliminacji obejmują zanieczyszczoną zawartość układu pokarmowego, chociaż po pierwszych 4–24 h etapu eliminacji zakłada się, że większość zanieczyszczonej zawartości układu pokarmowego zostaje zastąpiona czystym osadem (11)(47). Stężenie w organizmach z tej próbki można wówczas uznać za stężenie w tkance po opróżnieniu układu pokarmowego. Aby uwzględnić rozcieńczenie stężenia badanej substancji przez niezanieczyszczony osad na etapie eliminacji, masę zawartości układu pokarmowego można oszacować na podstawie stosunku mokrej masy organizmu/masy popiołu z organizmu lub suchej masy organizmów/masy popiołu z organizmu.
62. Jeżeli celem szczegółowego badania jest zmierzenie biodostępności i faktycznej pozostałości w tkankach organizmów użytych do badania, wówczas należy pobrać podpróbki organizmów wykorzystanych w badaniu (np. z trzech dodatkowych naczyń z kontrolnymi), najlepiej podczas stanu ustalonego, oraz zważyć je, oczyścić z zawartości układu pokarmowego w czystej wodzie przez okres 6 godzin (47) i ponownie zważyć przed analizą. Dane dotyczące masy organizmów i stężenia w ich ciele w przypadku tej podpróbki można następnie porównać z wartościami otrzymanymi z niewypróżnionych organizmów. Aby zminimalizować dodatkowy stres, na który narażone są zwierzęta, układy pokarmowe organizmów wyznaczonych do pomiaru eliminacji nie powinny być wypróżnione przed przeniesieniem do czystego osadu.
63. Najlepiej jest analizować wodę, osad i próbki organizmów bezpośrednio (tj. w ciągu 1–2 dni) po usunięciu, aby zapobiec rozkładowi lub innym stratom, a także w celu obliczenia przybliżonego tempa absorpcji i eliminacji w trakcie trwania badania. Bezpośrednia analiza pozwala również uniknąć opóźnień w określaniu momentu osiągnięcia stanu równowagi.
64. Jeżeli analizy nie wykona się bezpośrednio, próbki należy przechowywać we właściwych warunkach. Przed rozpoczęciem badania należy uzyskać informacje na temat stabilności i właściwych warunków przechowywania określonej substancji badanej (np. czasu i temperatury przechowywania, procedur ekstrakcji itd.). Jeżeli takie informacje nie są dostępne, a uznaje się je za niezbędne, można równolegle wykonać badanie wzbogaconych tkanek kontrolnych w celu ustalenia stabilności przechowywania.

Jakość metody analitycznej

65. Ze względu na to, że cała procedura uzależniona jest zasadniczo od dokładności, precyzji i czułości metody analitycznej wykorzystywanej w odniesieniu do badanej substancji, należy sprawdzić doświadczalnie, czy precyzja oraz powtarzalność analizy chemicznej, a także odzysk badanej substancji z wody, osadu i z organizmów są wystarczające w odniesieniu do danej metody. Należy także sprawdzić, czy badana substancja nie jest wykrywalna w komorach z próbkami kontrolnymi w stężeniach wyższych niż tło. W razie konieczności należy skorygować wartości C_w , C_s i C_a w odniesieniu do odzysków i wartości tła prób kontrolnych. Przez cały czas trwania badania ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się w taki sposób, by zminimalizować ich zanieczyszczenie i straty (np. wynikające z adsorpcji badanej substancji na przyrządzie do pobierania próbek).
66. Odzysk całkowity oraz odzysk badanej substancji w organizmach, osadzie, wodzie, a także, jeśli zastosowano, w pułapkach zawierających absorbenty umożliwiające zatrzymanie odparowującej badanej substancji, należy zanotować i zamieścić w sprawozdaniu.
67. W związku z tym, że zaleca się stosowanie substancji oznakowanej izotopowo, można przeprowadzić analizę całkowitej radioaktywności (np. substancji macierzystej i produktów degradacji). Jeżeli jednak jest to możliwe pod względem analitycznym, oznaczenie ilościowe substancji macierzystej i produktów degradacji w stanie ustalonym lub na końcu etapu absorpcji może dostarczyć ważnych informacji. Jeżeli zamierza się wykonać takie pomiary, próbki należy wówczas poddać właściwym procedurom ekstrakcji, aby można było oddzielnie przeprowadzić oznaczanie ilościowe substancji macierzystej. W przypadku gdy wykryty produkt degradacji stanowi znaczącą procentową część (np. >10 %) radioaktywności mierzonej w organizmach użytych do badania w stanie ustalonym lub na koniec etapu absorpcji, zaleca się dokonanie identyfikacji takich produktów degradacji (5).

68. W związku z niską indywidualną biomasą często nie jest możliwe oznaczenie stężenia badanej substancji w każdym organizmie, chyba że jako gatunek badany wykorzystuje się *Branchiura sowerbyi* (40–50 mg mokrej masy na organizm) (11). Łączenie osobników pobranych z konkretnego naczynia badawczego jest dopuszczalne, ale ogranicza procedury statystyczne, które można zastosować do danych. Jeśli istotne jest zastosowanie konkretnej procedury statystycznej i mocy statystycznej, należy w badaniu zastosować odpowiednią liczbę zwierząt lub komór badawczych z kontrpróbami w celu pogodzenia pożądanegołączenia, procedury i mocy.
69. Zaleca się, by współczynnik bioakumulacji był wyrażony zarówno jako funkcja całkowitej mokrej masy, całkowitej suchej masy oraz, w razie konieczności (np. w przypadku wysoce lipofilnych substancji), jako funkcja zawartości lipidów i zawartości całkowitego węgla organicznego w osadzie. Do oznaczenia zawartości lipidów należy zastosować odpowiednie metody (48)(49). Jako standardową metodę (48) można zalecać metodę ekstrakcji chloroformem/metanolem (50). Aby jednak uniknąć stosowania rozpuszczalników chlorowanych, należy zastosować potwierdzoną w badaniu międzylaboratoryjnym metodę Bligha i Dyer'a (50) zgodnie z opisem w (51). Ponieważ różne metody nie dają identycznych wartości (48), ważne jest podanie szczegółów dotyczących wykorzystanej metody. Jeśli jest to możliwe, tj. jeśli jest dostępna wystarczająca ilość tkanki organizmów, pomiar zawartości lipidów należy przeprowadzić z użyciem tej samej próbki lub ekstraktu, których użyto do analizy badanej substancji, ponieważ lipidy często należy usuwać z ekstraktu przed jego analizą chromatograficzną (5). Praktyczne jest jednak wykorzystywanie zaaklimatyzowanych zwierząt z próby kontrolnej co najmniej na początku lub – najlepiej – na końcu etapu absorpcji do pomiaru zawartości lipidów, np. w trzech próbkach.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

70. Krzywą absorpcji badanej substancji uzyskuje się, wykreślając w skali arytmetycznej jej stężenia w/na organizmach na etapie absorpcji w funkcji czasu. Jeżeli krzywa osiągnie stan równowagi, należy obliczyć BAF_{ss} dla stanu ustalonego:

$$\frac{C_a \text{ w stanie ustalonym lub w 28. dniu (średnia)}}{C_a \text{ w stanie ustalonym lub w 28. dniu (średnia)}}$$

71. Należy określić kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAFK) jako stosunek ks/ke . Stałą szybkości eliminacji (ke) określa się zazwyczaj na podstawie krzywej eliminacji (tj. wykresu stężenia badanej substancji w organizmach na etapie eliminacji). Stałą szybkości absorpcji ks oblicza się następnie na podstawie kinetyki krzywej absorpcji. Preferowaną metodą uzyskania BAFK oraz stałych szybkości, ks i ke , jest zastosowanie nieliniowych komputerowych metod estymacji parametrycznej (zob. dodatek 2). Jeśli w sposób ewidentny eliminacja nie jest procesem pierwszego rzędu, należy zastosować bardziej złożone modele (25)(27)(52).
72. Współczynnik bioakumulacji organizmy żywe-osad (BSAF) określa się przez normalizację BAFK dla zawartości lipidów w organizmach i zawartości całkowitego węgla organicznego w osadzie.

Interpretacja wyników

73. Wyniki powinny być interpretowane z rozważą w przypadku, gdy mierzone badane stężenia występują na poziomach zbliżonych do granicy wykrywalności metody analitycznej.
74. Jasno określone krzywe absorpcji i eliminacji wskazują na dobrej jakości dane bioakumulacji. Ogólnie granice ufności dla wartości BAF uzyskanych w ramach dobrze zaprojektowanego podejścia badawczego nie powinny przekraczać 25 % (5).

Sprawozdanie z badania

75. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje.

Badana substancja

- cechy fizyczne i własności fizykochemiczne, np. $\log K_{ow}$, rozpuszczalność w wodzie;
- dane dotyczące tożsamości substancji chemicznej; źródło badanej substancji, nazwy i stężenie wszelkich zastosowanych rozpuszczalników;
- w przypadku zastosowania badanej substancji oznakowanej izotopowo, dokładne położenie oznakowanych atomów, promieniotwórczość właściwa oraz procent promieniotwórczości powiązany z zanieczyszczeniami.

Badane gatunki

- nazwa systematyczna, szczep, źródło, wszelkie przypadki wcześniejszych zabiegów, aklimatyzacja, wiek, rozmiar-zakres itp.

Warunki badania

- zastosowana procedura badawcza (np. statyczna, półstatyczna lub przepływowa);
- rodzaj i charakterystyka zastosowanego oświetlenia i fotoperiod(y);
- projekt badania (np. liczba i rozmiar komór badawczych, objętość wody, masa i objętość osadu, tempo wymiany objętości wody (w przypadku procedury przepływowej i półstatycznej), napowietrzanie zastosowane przed badaniem i podczas badania, liczba kontrprób, liczba organizmów w każdej kontrpróbie, liczba badanych stężeń, czas trwania etapów absorpcji i eliminacji, częstotliwość pobierania próbek);
- metoda przygotowania i zastosowania badanej substancji, a także uzasadnienie wyboru konkretnej metody;
- badane stężenia nominalne;
- źródło składników sztucznej wody lub osadu lub – w przypadku zastosowania naturalnego środowiska – pochodzenie wody i osadu, opis wszelkich wcześniejszych procesów, jakim została poddana, wyniki wykazania, że zwierzęta użyte do badań posiadają zdolność przeżycia i rozmnażania w zastosowanych środowiskach, charakterystyka osadu (pH, całkowita zawartość amoniaku w wodzie porowej, zawartość całkowitego węgla organicznego, rozkład wielkości cząstek (procent piasku, ilu i gliny), procentowa zawartość wody i wszelkie inne dokonane pomiary) oraz charakterystyka wody (pH, twardość, przewodność właściwa, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziomy chloru resztkowego (jeżeli zostały zmierzone) i wszelkie inne wykonane pomiary);
- nominalna i zmierzona sucha masa w % mokrej masy (lub stosunek suchej masy do mokrej masy) sztucznego osadu; zmierzona sucha masa w % mokrej masy (lub stosunek suchej masy do mokrej masy) w przypadku osadów pobranych w terenie;
- jakość wody wewnątrz komór badawczych scharakteryzowana przez temperaturę, pH, zawartość amoniaku, całkowitą twardość i stężenie rozpuszczonego tlenu;
- szczegółowe informacje na temat traktowania próbek wody, osadu i organizmów, w tym szczegółowe informacje na temat procedur przygotowania, przechowywania, wzbogacania, ekstrakcji oraz procedur analitycznych (i precyzji) zastosowanych w odniesieniu do badanej substancji oraz zawartości lipidów, a także odzysku badanej substancji.

Wyniki

- śmiertelność organizmów kontrolnych i organizmów w każdej komorze badawczej oraz wszelkie zaobserwowane skutki subletalne, w tym nietypowe zachowania (np. unikanie osadu, obecność lub brak obecności odchodów, brak rozmnażania się);
- zmierzona sucha masa w % mokrej masy (lub stosunek suchej masy do mokrej masy) osadu i organizmów użytych do badania (przydatne do normalizacji);
- zawartość lipidów w organizmach;
- krzywe pokazujące kinetykę absorpcji i eliminacji badanej substancji w organizmach, oraz okres konieczny do osiągnięcia stanu ustalonego;
- C_a , C_s i C_w (wraz z odchyleniem standardowym i zakresem, w stosownych przypadkach) dla wszystkich przypadków pobierania próbek (C_a wyrażone jako g na kg^{-1} mokrej i suchej masy całego ciała, a C_s wyrażone jako g na kg^{-1} mokrej i suchej masy osadu i C_w wyrażone w mg na l^{-1}). Jeśli wymagany jest współczynnik akumulacji organizmy żywe-osad (BASF; zob. definicja w dodatku 1) (np. na potrzeby porównania wyników z dwóch lub większej liczby badań przeprowadzonych z wykorzystaniem zwierząt o różnej zawartości lipidów), C_a można dodatkowo wyrazić w g na kg^{-1} zawartości lipidów organizmu, a C_s należy wyrazić w g na kg^{-1} węgla organicznego w osadzie;

- współczynnik bioakumulacji (BAF) (wyrażony w kg mokrego osadu na kg^{-1} mokrych organizmów), stała tempa absorpcji osadu k_s (wyrażona w g mokrego osadu na kg^{-1} mokrych organizmów d^{-1}) oraz stała tempa eliminacji k_e (wyrażona w d^{-1}); współczynnik BASF (wyrażony w kg zawartości węgla organicznego w osadzie na kg^{-1} zawartości lipidów w organizmach) można dodatkowo przedstawić w sprawozdaniu;
- niewyeliminowane pozostałości na końcu etapu eliminacji;
- jeżeli zmierzono: procent macierzystej substancji, produktów degradacji oraz związanych substancji resztkowych (tj. procent badanej substancji, która nie może zostać poddana ekstrakcji za pomocą powszechnych metod ekstrakcji) wykryte w glebie i zwierzętach użytych do badania;
- metody statystyczne zastosowane do analizy danych.

Ocena wyników

- zgodność wyników z kryteriami ważności wymienionymi w pkt 21;
 - nieoczekiwane lub niestandardowe wyniki, np. niepełna eliminacja badanej substancji ze zwierząt użytych do badania; w takich przypadkach wyniki z dowolnych badań wstępnych mogą dostarczyć przydatnych informacji.
-

Dodatek 1

Definicje i jednostki

Sztuczny osad lub preparowany, odtworzony lub syntetyczny, stanowi mieszaninę materiałów używaną do naśladowania składników fizycznych naturalnego osadu.

Bioakumulacja to wzrost stężenia badanej substancji w organizmie lub na organizmie w stosunku do stężenia badanej substancji w otaczającym środowisku. Bioakumulacja wynika zarówno z procesu biokoncentracji, jak i z procesu biomagnifikacji (zob. poniżej).

Współczynnik bioakumulacji (BAF) w dowolnym momencie etapu absorpcji w trakcie opisanego tu badania bioakumulacji to stężenie badanej substancji w/na organizmie użytym do badania (C_a wyrażone w g·na kg⁻¹ mokrej lub suchej masy organizmu) podzielone przez stężenie substancji w otaczającym środowisku (C_s wyrażone jako g·na kg⁻¹ mokrej lub suchej masy osadu). Aby odnieść się do jednostek C_a i C_s , jednostką współczynnika bioakumulacji jest kg masy osadu na kg⁻¹ masy organizmu (15).

Współczynniki bioakumulacji obliczane bezpośrednio na podstawie stosunku stałej szybkości absorpcji osadu do stałych szybkości eliminacji (k_s oraz k_e , odpowiednio, zob. poniżej) nazywa się kinetycznym współczynnikiem bioakumulacji (BAF_k).

Biokoncentracja to wzrost stężenia badanej substancji w lub na organizmie, wynikający wyłącznie z pobierania substancji przez powierzchnię ciała, w stosunku do stężenia badanej substancji w otaczającym środowisku.

Biomagnifikacja to wzrost stężenia badanej substancji w/na organizmie, wynikający głównie z pobierania zanieczyszczonego pokarmu lub żeru, w stosunku do stężenia badanej substancji w pokarmie lub żerze. Biomagnifikacja może prowadzić do przeniesienia lub akumulacji badanej substancji w ramach sieci pokarmowych.

Współczynnik akumulacji organizmu żywe-osad (BSAF) stanowi stężenie w stanie ustalonym badanej substancji o znormalizowanym poziomie lipidów w/na organizmie użytym do badania, podzielone przez stężenie w stanie ustalonym badanej substancji o znormalizowanym poziomie węgla organicznego w osadzie. C_a w takim przypadku wyraża się w g·na kg⁻¹ zawartości lipidów w organizmie, a C_s w g·na kg⁻¹ zawartości substancji organicznych w osadzie.

Okres kondycjonowania stosuje się w celu ustabilizowania komponentu mikrobiologicznego osadu i usunięcia np. amoniaku pochodzącego z komponentów osadu; ma miejsce przed wzbogaceniem osadu badaną substancją. Zwykle woda nadosadowa jest odrzucana po kondycjonowaniu.

Eliminacja badanej substancji to strata takiej substancji z tkanki organizmu użytego do badań w drodze czynnych lub biernych procesów, przy czym taka strata zachodzi niezależnie od obecności lub braku badanej substancji w otaczającym środowisku.

Etap eliminacji to okres następujący po przeniesieniu organizmów użytych do badania z zanieczyszczonego środowiska do środowiska niezawierającego badanej substancji, w którym bada się eliminację (lub stratę netto) substancji z badanych organizmów.

Stała szybkości eliminacji (k_e) to wartość liczbową określająca szybkość zmniejszania się stężenia badanej substancji w/na organizmie użytym do badania, po przeniesieniu organizmów użytych do badania ze środowiska zawierającego badaną substancję do środowiska niezawierającego substancji chemicznych; k_e wyraża się w d⁻¹.

Etap ustalania stanu równowagi stosuje się w celu rozprowadzenia badanej substancji między fazę stałą, wodę porową i wodę nadosadową; ma miejsce po wzbogaceniu osadu badaną substancją i przed dodaniem organizmów użytych do badania.

Współczynnik podziału oktanol-woda (K_{ow}) to stosunek rozpuszczalności substancji chemicznej w n-oktanolu i w wodzie w warunkach równowagi, określany czasami także jako współczynnik P_{ow} . Logarytm K_{ow} (log K_{ow}) wykorzystuje się jako wskaźnik zdolności substancji chemicznej do bioakumulacji w organizmach wodnych.

Współczynnik podziału węgiel organiczny-woda (K_{oc}) to stosunek stężenia substancji w/na frakcji węgla organicznego osadu i stężenia substancji chemicznej w wodzie w warunkach równowagi.

Warstwa wody nadosadowej to woda, którą zalano osad w naczyniu badawczym.

Stan równowagi lub **stan ustalony** określa się jako równowagę między procesem absorpcji a procesem eliminacji, które zachodzą równolegle podczas etapu narażenia. Stan ustalony zostaje osiągnięty na wykresie współczynnika bioakumulacji w każdym okresie pobierania próbek względem czasu w momencie, kiedy krzywa staje się równoległa do osi czasu, a trzy następujące po sobie analizy współczynnika bioakumulacji, wykonane na próbkach pobranych w odstępach co najmniej dwóch dni, różnią się od siebie nie więcej niż o 20 % i między trzema okresami pobierania próbek nie ma statystycznie istotnych różnic. W odniesieniu do badanych substancji, które wolno ulegają absorpcji, bardziej odpowiednie będą odstępy czasowe wynoszące siedem dni (5).

Woda porowa to woda wypełniająca przestrzeń między cząstkami osadu lub gleby.

Stała szybkości absorpcji osadu (k_s) stanowi wartość liczbową określającą szybkość wzrostu stężenia badanej substancji w/na organizmie użytym do badania, wynikającego z etapu absorpcji substancji z osadu. k_s wyraża się w g osadu na kg^{-1} organizmu na d^{-1} .

Osad wzbogacony to osad, do którego dodano badaną substancję.

Współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym (BAF_{ss}) to współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym, który nie zmienia się w znaczący sposób przez długi okres czasu, a stężenie badanej substancji w otaczającym środowisku (C_s wyrażane w g na kg^{-1} mokrej lub suchej masy osadu) jest w tym okresie stałe.

Etap absorpcji lub narażenia to okres, w którym organizmy użyte do badań poddaje się narażeniu na działanie badanej substancji.

Dodatek 2

Obliczanie parametrów absorpcji i eliminacji

Głównym punktem końcowym badania bioakumulacji jest współczynnik bioakumulacji. Zmierzony współczynnik bioakumulacji można obliczyć poprzez podzielenie stężenia w organizmie użytym do badań, C_a , przez stężenie badanej substancji w osadzie, C_s , w stanie ustalonym. Jeśli podczas etapu absorpcji nie osiągnięto stanu ustalonego, współczynnik bioakumulacji oblicza się w ten sam sposób na dzień 28. Należy jednak zwrócić uwagę, czy współczynnik bioakumulacji jest oparty na stężeniach w stanie ustalonym, czy też nie.

Kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAF_K), stałą szybkości absorpcji osadu (k_s) i stałą szybkości eliminacji (k_e) uzyskuje się zazwyczaj, stosując komputerowe, nieliniowe metody estymacji parametrycznej. Mając szereg czasowy przeciętnych czynników akumulacji (C_a , średnie wartości na każdy dzień pobierania próbek/ C_s , średnie wartości dla każdego dnia pobierania próbek = AF) dla etapu absorpcji na podstawie mokrej masy organizmów i osadu, oraz równanie modelowe

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{-k_e \times t}) \quad [\text{równanie 1}]$$

w którym $AF(t)$ to stosunek stężenia badanej substancji w organizmach i jej stężenia w osadzie w dowolnym punkcie czasowym (t) etapu absorpcji, wartości BAF_K , k_s i k_e obliczane są za pomocą tych programów komputerowych.

W przypadku osiągnięcia stanu ustalonego podczas etapu absorpcji (tj. $t = \infty$) równanie 1 można zredukować do:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \quad [\text{równanie 2}]$$

gdzie:

k_s = stała szybkości absorpcji w tkance [g osadu na kg^{-1} organizmu]

k_e = stała szybkości eliminacji [d^{-1}]

Stężenie badanej substancji w tkance organizmu w stanie ustalonym ($C_{a,ss}$) oblicza się wtedy za pomocą $k_s/k_e \times C_s$.

Współczynnik akumulacji organizmy żywe-osad można obliczyć w następujący sposób:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

gdzie f_{oc} stanowi frakcję węgla organicznego w osadzie, a f_{lip} – frakcję lipidów w organizmie, przy czym wartości te należy określić na podstawie albo suchej masy, albo mokrej masy.

Mając czasowy szereg wartości stężenia można modelować kinetykę eliminacji, stosując następujące równania modelu i obliczenia komputerowe w oparciu o nieliniową metodę estymacji parametrycznej.

Średnia zmierzona ilość pozostałości w organizmie na końcu etapu absorpcji jest zalecana jako standardowy punkt początkowy. Wartości modelowane/oszacowane na podstawie etapu absorpcji należy wykorzystać, jeżeli np. zmierzona wartość znacznie odbiega od modelowanej wartości pozostałości w organizmie. Alternatywne wstępne narażenie organizmów wyznaczonych do eliminacji można znaleźć w pkt 50; w przypadku tego podejścia uważa się, że próbki tych wstępnie narażonych organizmów w dniu 0 etapu eliminacji dostarczają realistycznej ilości pozostałości w ciele, aby umożliwić rozpoczęcie kinetyki eliminacji.

Jeśli dane pomiarowe wykreślone w funkcji czasu wskazują na stały wykładniczy spadek stężenia badanej substancji w zwierzętach, do opisanego przebiegu eliminacji w czasie można zastosować model jednopredziałowy (równanie 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{równanie 3}]$$

Procesy eliminacji czasami okazują się dwufazowe, wykazując szybki spadek C_a na wczesnych etapach, który zmienia się w wolniejszą stratę badanych substancji na późniejszych etapach eliminacji (8)(19)(25)). Oba etapy można interpretować, zakładając, że w organizmie istnieją dwa różne przedziały, z których badana substancja jest eliminowana z różną szybkością. W takich przypadkach należy przeanalizować odnośną literaturę, np. (15)(16)(17)(25).

Eliminację z dwóch przedziałów opisuje np. następujące równanie (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \quad [\text{równanie 4}]$$

A i B oznaczają wielkość przedziałów (w procentach całkowitych pozostałości w tkankach), przy czym A to przedział, w którym utrata substancji zachodzi szybko, zaś B to przedział, w którym utrata badanej substancji zachodzi powoli. Suma A i B wynosi 100 % całej objętości przedziału zwierzęcia w stanie ustalonym, k_a i k_b oznaczają odpowiadające im stałe eliminacji [d^{-1}]. Jeżeli model z dwoma przedziałami zostanie dopasowany do danych dotyczących oczyszczania, stałą szybkości absorpcji k_s można wyznaczyć w następujący sposób (53)(54):

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

Niemniej jednak takie modelowe równania należy stosować z ostrożnością, zwłaszcza jeśli podczas badania zachodzą zmiany w biodostępności badanej substancji (42).

Zamiast przedstawionych powyżej modelowych równań można obliczyć parametry kinetyczne (k_s i k_e), stosując również model kinetyczny pierwszego rzędu do wszystkich danych z etapu absorpcji i eliminacji łącznie. Opis metody, która pozwala na takie połączone obliczanie stałych tempa absorpcji i eliminacji, można znaleźć w pozycjach bibliografii (55), (56) i (57).

Niewyeliminowane pozostałości należy obliczyć jako dodatkowy punkt końcowy, mnożąc stosunek średniego stężenia w organizmach (C_a) w 10. dniu etapu eliminacji i średniego stężenia w organizmach (C_a) w stanie ustalonym (28. dzień etapu absorpcji) przez 100:

$$NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ na końcu eliminacji (średnie)} \times 100}{C_a \text{ w stanie ustalonym (średnie)}}$$

Dodatek 3

Przykład harmonogramu pobierania próbek w 28-dniowym badaniu bioakumulacji**a) Etap absorpcji (obejmujący 4-dniowy etap ustalania stanu równowagi)**

Dzień	Czynności
– 6	Przygotowanie zawiesiny torfu na osad; kondycjonowanie zawiesiny przez 48 h;
– 4	wzbogacanie osadu lub części osadu; mieszanie wszystkich składników osadu; usunięcie próbek osadu poddanego działaniu substancji i osadu z próby kontrolnej rozpuszczalnika w celu oznaczenia stężenia badanej substancji; dodanie wody nadosadowej; inkubacja w warunkach badania (etap ustalania stanu równowagi);
– 3-2.	oddzielenie organizmów użytych do badania od hodowli w celu ich aklimatyzacji;
0	pomiar jakości wody (zob. pkt 52); usunięcie kontrprób w celu pobrania próbek wody i osadu na potrzeby ustalenia stężenia badanej substancji; losowe rozmieszczanie organizmów w komorach badawczych; zachowanie wystarczającej liczby podprób organizmów w celu oznaczenia analitycznych wartości tła; kontrola dopływu powietrza, jeżeli stosuje się zamknięty układ badawczy;
1	Usunięcie kontrpróby w celu pobrania próbek; kontrola dopływu powietrza, zachowań organizmów, jakości wody (zob. pkt 56); pobranie próbek wody, osadu i organizmów w celu oznaczenia stężenia badanej substancji;
2	kontrola dopływu powietrza, zachowań organizmów i temperatury;
3	jak w 1. dniu;
4 – 6	jak w 2. dniu;
7	jak w 1. dniu; w razie potrzeby uzupełnić odparowaną wodę;
8 – 13	jak w 2. dniu;
14	jak w 1. dniu; w razie potrzeby uzupełnić odparowaną wodę;
15 – 20	jak w 2. dniu;
21	jak w 1. dniu; w razie potrzeby uzupełnić odparowaną wodę;
22 – 27	jak w 2. dniu;
28	jak w 1. dniu; pomiar jakości wody (zob. pkt 52); koniec etapu absorpcji; zachowanie wystarczającej liczby podprób organizmów na potrzeby określenia analitycznych wartości dotyczących tła, mokrej i suchej masy oraz zawartości lipidów; przeniesienie organizmów z pozostałych kontrprób narażonych na działanie substancji do naczyń zawierających czysty osad w celu przeprowadzenia etapu eliminacji (bez opróżniania przewodu pokarmowego); pobranie próbek wody, osadu i organizmów z prób kontrolnych rozpuszczalnika; pobranie próbek roztworów do pułapek, jeżeli je zainstalowano.
	Czynności wykonywane przed narażeniem (etap osiągnięcia równowagi) należy zaplanować w czasie, uwzględniając właściwości badanej substancji. Jeżeli jest to wymagane, kondycjonowanie przygotowanego osadu poniżej wody nadosadowej w temperaturze 20 ± 2 °C przez 7 dni; w tym przypadku wcześniejsze przygotowanie osadu!
	Czynności opisane dla 2. dnia należy wykonywać codziennie (co najmniej w dni robocze).

b) **Etap eliminacji**

Dzień	Czynności
– 6	Przygotowanie zawiesiny torfu na osad; kondycjonowanie zawiesiny przez 48 h;
– 4	mieszanie wszystkich składników osadu; usunięcie próbek osadu poddanego działaniu substancji i osadu z próby kontrolnej rozpuszczalnika w celu oznaczenia stężenia badanej substancji; dodanie wody nadosadowej; inkubacja w warunkach badania;
0 (28. dzień etapu absorpcji)	pomiar jakości wody (zob. pkt 52); należy przenieść organizmy z pozostałych kontrprób narażonych na działanie substancji do naczyń zawierających czysty osad; po 4–6 h usunięcie kontrprób w celu pobrania próbek wody, osadu i organizmów w celu ustalenia stężenia badanej substancji; losowe rozmieszczanie organizmów w komorach badawczych;
1	Usunięcie kontrpróby w celu pobrania próbek; kontrola dopływu powietrza, zachowań organizmów, jakości wody (zob. pkt 52); pobranie wody, osadu i próbek organizmów w celu oznaczenia stężenia badanej substancji;
2	kontrola dopływu powietrza, zachowań organizmów i temperatury;
3	jak w 1. dniu;
4	jak w 2. dniu;
5	jak w 1. dniu;
6	jak w 2. dniu;
7	jak w 1. dniu; w razie potrzeby uzupełnić odparowaną wodę;
8 – 9	jak w 2. dniu;
10	jak w 1. dniu; koniec etapu eliminacji; pomiar jakości wody (zob. pkt 52); pobranie próbek wody, osadu i organizmów z prób kontrolnych rozpuszczalnika; pobranie próbek roztworów do pułapek, jeżeli je zainstalowano.
	Przygotowanie osadu przed rozpoczęciem etapu eliminacji należy przeprowadzać w taki sam sposób, w jaki miało to miejsce w przypadku etapu absorpcji.
	Czynności opisane dla 2. dnia należy wykonywać codziennie (co najmniej w dni robocze).

Dodatek 4

Niektóre własności fizykochemiczne wody nadającej się do rozcieńczania

SKŁADNIK	STĘŻENIA
Cząstki stałe	< 20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	< 2 µg/l
Niezjonizowany amoniak	< 1 µg/l
Chlor resztkowy	< 10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	< 50 ng/l
Pestycydy chloroorganiczne ogółem plus polichlorowane bifenyle	< 50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	< 25 ng/l

SKŁAD ZALECANEJ WODY REGENEROWANEJ

a) Roztwór chlorku wapnia

Rozpuścić 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ w wodzie dejonizowanej; dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

b) Roztwór siarczanu magnezu

Rozpuścić 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w wodzie dejonizowanej; dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

c) Roztwór wodorowęglanu sodu

Rozpuścić 2,59 g NaHCO_3 w wodzie dejonizowanej; dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

d) Roztwór chlorku potasu

Rozpuścić 0,23 g KCl w wodzie dejonizowanej; dopełnić do 1 l wodą dejonizowaną.

Wszystkie związki chemiczne muszą być przeznaczone do analiz.

Przewodność właściwa wody destylowanej lub dejonizowanej nie powinna przekraczać $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Należy wymieszać 25 ml każdego z roztworów od a) do d) i dopełnić całkowitą objętość wodą dejonizowaną do 1 l. Suma jonów wapnia i magnezu w tym roztworze wynosi 2,5 mmol/l.

Stosunek jonów Ca:Mg wynosi 4:1, a jonów Na:K wynosi 10:1. Pojemność kwasowa $K_{\text{S4.3}}$ w tym roztworze wynosi 0,8 mmol/l.

Wodę rozcieńczającą należy poddać napowietrzaniu do osiągnięcia nasycenia tlenem, a następnie przechowywać przez około dwa dni bez dalszego napowietrzania przed zastosowaniem.

pH wody nadającej się do rozcieńczania powinno mieścić się w zakresie 6–9.

Dodatek 5

Osad sztuczny – zalecenia dotyczące przygotowania i przechowywania

W przeciwieństwie do wymogów zawartych w metodzie badawczej C.8 (40) zaleca się, aby zawartość torfu w sztucznym osadzie wynosiła 2 % zamiast 10 % suchej masy, tak aby odpowiadała niskiej do średniej zawartości organicznych osadów naturalnych (58).

Procentowa zawartość suchych składników sztucznego osadu:

Składnik	Właściwości	% suchego osadu
Torf	Torf sfagnowy, o »średnim« stopniu rozkładu, suszony na powietrzu, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielony (wielkość cząstek $\leq 0,5$ mm)	$2 \pm 0,5$
Piasek kwarcowy	Wielkość ziaren: ≤ 2 mm, ale > 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm	76
Glinka kaolinowa	Zawartość kaolinitu ≥ 30 %	22 ± 1
Źródło pokarmu	<i>Folia urticae</i> , sproszkowane liście <i>Urtica</i> sp. (pokrzywy zwyczajnej), drobno zmielone (wielkość cząstek $\leq 0,5$ mm) lub mieszanina sproszkowanych liści <i>Urtica</i> sp. i alfa-celulozy (1:1); zgodna z farmaceutycznymi standardami dotyczącymi spożycia przez ludzi, jako dodatek do suchego osadu	0,4 – 0,5 %
Węglan wapnia	Węglan wapnia CaCO_3 , sproszkowany, chemicznie czysty, jako dodatek do suchego osadu	0,5 – 1
Woda dejonizowana	Przewodność właściwa ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$, jako dodatek do suchego osadu	30 – 50

Jeżeli przewiduje się podwyższone stężenia amoniaku, np. jeżeli wiadomo, że badana substancja hamuje nityfikację, użyteczne może być zastąpienie 50 % bogatego w azot sproszkowanej pokrzywy celulozą (np. chemicznie czystym proszkiem z celulozy, wielkość cząstek $\leq 0,5$ mm).

Przygotowanie

Torf suszy się na powietrzu i mieli na drobny proszek (wielkość ziaren $\leq 0,5$ mm, brak widocznych pozostałości roślin). Zawieszinę wymaganej ilości proszku torfowego przygotowuje się za pomocą wysokosprawnego urządzenia do homogenizacji, dodając porcję dejonizowanej wody do suchego osadu (objętość wody odpowiednia do przygotowania mieszalnego mułu torfowego wynosi 11,5 x suchej masy torfu (8)).

Wartość pH zawiesiny koryguje się do poziomu $5,5 \pm 0,5$ stosując CaCO_3 . W celu ustabilizowania pH i komponentu mikrobiologicznego zawieszinę kondycjonuje się przez co najmniej dwa dni w temperaturze 20 ± 2 °C, delikatnie ją mieszając. Wartość pH mierzy się ponownie i koryguje w miarę potrzeby za pomocą CaCO_3 do poziomu $6,0 \pm 0,5$. Następnie całą zawieszinę miesza się z innymi suchymi składnikami, uwzględniając wszystkie części użyte do wzbogacenia. W celu uzyskania jednorodnego osadu dodaje się pozostałą dejonizowaną wodę. Ponownie mierzy się pH i koryguje w miarę potrzeby za pomocą CaCO_3 do poziomu 6,5–7,5. Jeżeli jednak przewiduje się powstawanie amoniaku, przydatne może okazać się utrzymywanie pH w osadzie poniżej 7,0 (np. w zakresie 6,0–6,5). Próbkę osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość węgla organicznego. Jeżeli przewiduje się powstawanie amoniaku, możliwe jest kondycjonowanie sztucznego osadu przez siedem dni w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania (np. stosunek osad-woda 1: 4, wysokość warstwy osadu jak w naczyniach badawczych) przed wzbogaceniem go badaną substancją, tj. należy uzupełnić go wodą, która powinna zostać napowietrzona. Na koniec okresu kondycjonowania należy usunąć i odrzucić wodę nadosadową. Próbkę osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość całkowitego węgla organicznego (np. 3 próbki).

Następnie wzbogacony piasek kwarcowy miesza się z osadem na każdym poziomie zabiegu, osad rozdziela się do naczyń badawczych stanowiących kontrpróby i uzupełnia wodą do badania (np. wskaźnik osad-woda 1: 4, wysokość warstwy osadu jak w naczyniach badawczych). Naczynia są następnie inkubowane w takich samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania. W tym momencie rozpoczyna się okres ustalania równowagi. Warstwa wody nadosadowej powinna być napowietrzona.

Wybrane źródło pokarmu należy dodać przed lub w trakcie wzbogacania osadu badaną substancją. Pokarm może zostać zmieszany z zawiesiną torfową (zob. powyżej). Można uniknąć nadmiernego rozkładu źródła pokarmu przed dodaniem organizmów użytych do badania, np. w przypadku długiego okresu ustalania równowagi, poprzez zastosowanie możliwie najkrótszego okresu między dodaniem pokarmu i rozpoczęciem narażenia. W celu zapewnienia wystarczającego kontaktu pokarmu z badaną substancją, źródło pożywienia należy wymieszać z osadem nie później niż w dniu wzbogacenia osadu badaną substancją. Jeżeli długość okresu ustalania równowagi prowadzi do nadmiernej degradacji mikrobiologicznej pokarmu przed dodaniem organizmów użytych do badania, dopuszcza się wyjątki. Próbkę osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość całkowitego węgla organicznego (np. 3 próbki wzbogaconego lub kontrolnego osadu).

Suchą masę dodatków (torfu, piasku, kaolinu) należy zapisać w gramach i procentach całkowitej suchej masy.

Należy również zanotować w procentach całkowitej suchej masy objętość wody dodawanej do suchych składników podczas przygotowywania osadu (np. 100 % suchej masy + 46 % wody oznacza, że do 1 000 g suchej masy dodaje się łącznie 460 ml wody, w wyniku czego powstaje 1 460 g mokrego osadu).

Przechowywanie

Suche składniki sztucznego osadu mogą być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu w temperaturze pokojowej. Przygotowany, mokry osad może być przechowywany (do późniejszego użytku tylko w hodowli) w temperaturze 4–2 °C bez dostępu światła przez 2–4 tygodni od dnia przygotowania (8).

Osad wzbogacony badaną substancją należy wykorzystać niezwłocznie, chyba że istnieją informacje wskazujące, że dany osad można przechowywać bez wpływu na toksyczność i biodostępność badanej substancji. Próbkę wzbogaconego osadu można, do czasu ich analizy, przechowywać w warunkach zalecanych w odniesieniu do danej badanej substancji.

Dodatek 6

Gatunki skąposzczetów zalecane do badania bioakumulacji***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Skąposzczety Tubificidae (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) żyją w osadach wód słodkich w rurek wypełnionych śluzem. W rurek tych organizmy zawieszone są głową w dół, zjadając cząstki osadu, wykorzystując przebywające w nim mikroorganizmy i szczątki organiczne. Zazwyczaj tylna część unosi się w warstwie wody nadosadowej, umożliwiając oddychanie. Mimo że gatunek ten zamieszkuje wiele różnych rodzajów osadu na całej półkuli północnej, *Tubifex tubifex* woli osady o stosunkowo drobnym uziarnieniu (59). Przydatność tego gatunku do badań ekotoksykologicznych przedstawiona została na przykład w (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Metody hodowli

Aby zapewnić wystarczającą liczbę *Tubifex tubifex* do przeprowadzania badań bioakumulacji, konieczne jest prowadzenie stałych hodowli laboratoryjnych organizmów. W przypadku hodowli *T. tubifex* (8) zaleca się zastosowanie systemu składającego się ze sztucznego osadu na bazie sztucznej gleby zgodnie z metodą badawczą C.8 (40) oraz z wody regenerowanej zgodnie z metodą badawczą C.1.

Jako naczynia do hodowli wykorzystać można pojemniki wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej o wysokości 12–20 cm. Każdy pojemnik z hodowlą wypełnia się warstwą mokrego sztucznego osadu sporządzoną w sposób opisany w dodatku 5. Głębokość warstwy osadu powinna umożliwić organizmom zakopywanie się (głębokość minimum 2 cm w przypadku *T. tubifex*), co jest ich naturalnym zachowaniem. Do systemu dodaje się wodę regenerowaną. Należy dążyć do zminimalizowania naruszenia osadu. Zbiornik z wodą delikatnie napowietrza się (np. 2 pęcherzyki powietrza na sekundę za pomocą powietrza filtrowanego 0,45 µm) przez pipetę Pasteura umieszczoną około 2 cm nad powierzchnią osadu. Zalecana temperatura hodowli wynosi 20 ± 2 °C.

Organizmy dodaje się do systemu hodowli do maksymalnego zagęszczenia 20 000 osobników na m² powierzchni osadu. Większe zagęszczenie może spowodować zmniejszenie wzrostu i tempa rozmnażania (43).

W przypadku hodowli w sztucznym osadzie organizmy należy karmić. Dieta składająca się z drobno zmielonego pokarmu dla ryb np. TetraMin® może służyć jako dodatkowy pokarm (8); Klerks 1994, informacje własne. Porcje pokarmu powinny zapewniać wystarczający wzrost i rozmnażanie oraz powinny utrzymywać na minimalnym poziomie odkładanie się amoniaku i wzrost grzybów w hodowli. Pokarm można podawać dwa razy w tygodniu (np. 0,6–0,8 mg na cm² powierzchni osadu). Praktyczne doświadczenie pokazało, że zastosowanie pokarmu w formie zawiesiny i poddanego homogenizacji w wodzie dejonizowanej może ułatwić jednorodne rozmieszczenie pożywienia na powierzchni osadu w pojemnikach z hodowlą.

Aby uniknąć odkładania się amoniaku, warstwę wody nadosadowej należy wymieniać, stosując układ przepływowy, lub manualnie, co najmniej raz w tygodniu. W kulturach wyjściowych osad należy wymieniać co trzy miesiące.

Pobieranie organizmów z hodowli można przeprowadzać, przesiewając osad kultury przez sito o wielkości oczek 1 mm, jeżeli potrzebne są tylko osobniki dorosłe. W celu oddzielenia pozostałych kokonów stosuje się sito o wielkości oczek 0,5 mm, a w przypadku młodych organizmów – sito o wielkości oczek 0,25 mm. Sita można umieścić w wodzie regenerowanej po przesianiu przez nie osadu. Organizmy opuszczają sito i mogą następnie być wyjmowane z wody za pomocą delikatnych stalowych pęset lub pipety z krawędziami nadtopionymi nad ogniem.

W celu rozpoczęcia badania lub założenia nowej hodowli stosuje się tylko nieuszkodzone i jednoznacznie zidentyfikowane osobniki *Tubifex tubifex* (np. (64)). Chore lub zranione organizmy, jak również kokony zakażone strzępkami grzybnymi, należy odrzucić.

Zsynchronizowana hodowla może stanowić źródło organizmów w określonym wieku i w odpowiednich odstępach czasu, kiedy zachodzi taka potrzeba. Nowe naczynia z hodowlą zakłada się w wybranych odstępach (np. co dwa tygodnie), rozpoczynając ze zwierzętami w określonym wieku (np. kokony). W opisanych w niniejszym dokumencie warunkach hodowli stosuje się dorosłe organizmy w wieku powyżej 8–10 tygodni. Z hodowli można zbierać osobniki, gdy organizmy złożą nowe kokony, np. po dziesięciu tygodniach. Pobrane dorosłe osobniki można wykorzystać w badaniach, a kokony można wykorzystać do zakładania nowych hodowli.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) również zamieszkują osady słodkich wód na całym świecie i są powszechnie wykorzystywana w badaniach ekotoksykologicznych. Informacje dotyczące biologii, warunków hodowli oraz wrażliwości gatunku przedstawione zostały w (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* mogą być również hodowane w sztucznym osadzie zalecanym dla *T. tubifex* zgodnie z (8) z pewnymi ograniczeniami. Ponieważ w przyrodzie *L. variegatus* wolą osad o grubszym uziarnieniu niż *T. tubifex* (59), hodowle laboratoryjne ze sztucznym osadem stosowanym w przypadku *T. tubifex* przestają istnieć po 4–6 miesiącach. Praktyczne doświadczenie pokazało, że *L. variegatus* mogą być utrzymywane w piaszczystym podłożu (np. piasek kwarcowy, drobny żwir) w układzie przepływowym, wykorzystując pokarm dla ryb jako źródło pokarmu, przez kilka lat bez odnawiania podłoża. Główną zaletę *L. variegatus* w stosunku do innych gatunków skąposzczetów wodnych stanowi ich szybkie rozmnażanie, prowadzące do szybkiego wzrostu biomasy populacji hodowanych w laboratoriach (1)(6)(9)(10).

Metody hodowli

Warunki hodowli w odniesieniu do *Lumbriculus variegatus* zostały szczegółowo przedstawione w Phipps i in. (1993) (10), Brunson i in. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Poniżej przedstawione zostało krótkie streszczenie tych warunków.

Organizmy można hodować w dużych akwariach (57–80 l), w temperaturze 23 °C z fotoperiodem wynoszącym 16 godzin światła: 8 godzin ciemności (100–1 000 luksów) stosując codziennie odnawianą naturalną wodę (45–50 l na akwarium). Podłoże przygotowuje się poprzez pocięcie niebielonych brązowych papierowych ręczników na paski, które można następnie na kilka sekund wymieszać z wodą do hodowli, aby wytworzyć małe kawałki papierowego podłoża. Podłoże można następnie użyć bezpośrednio w akwariach do hodowli *Lumbriculus*, pokrywając dno zbiornika, lub przechowywać zamrożone w dejonizowanej wodzie do późniejszego wykorzystania. Nowe podłoże w zbiorniku zasadniczo zachowa trwałość przez około dwa miesiące.

Każdą hodowlę rozpoczyna się od 500–1 000 organizmów karmionych 10 ml zawiesiny zawierającej 6 g pokarmu dla młodych pstrągów 3 razy w tygodniu w warunkach wymiany lub przepływu. W przypadku hodowli statycznych lub pół-statycznych dostarczane porcje pokarmu powinny być mniejsze, aby zapobiec rozwojowi bakterii i grzybów. Podłoże składające się z pokarmu i papieru należy przeanalizować pod kątem substancji wykorzystywanych w badaniach bioakumulacji.

W tych warunkach liczba osobników w hodowli zasadniczo ulega podwojeniu w trakcie 10–14 dni.

Lumbriculus variegatus mogą zostać usunięte z hodowli do oddzielnej zlewki, np. przez przesianie podłoża za pomocą siatki o drobnych oczkach lub wyjęcie organizmów za pomocą szklanej pipety o szerokim wylocie (około 5 mm średnicy) z krawędzią nadtopioną nad ogniem. Jeżeli do zlewki zostało również przeniesione podłoże, zlewkę zawierającą organizmy i podłoże pozostawia się na noc w warunkach przepływu, dzięki czemu podłoże zostanie usunięte ze zlewki, natomiast organizmy pozostaną na dnie naczynia. Można je następnie wprowadzić do nowo przygotowanych zbiorników do hodowli lub poddać dalszej obróbce na potrzeby badania jak przedstawiono w (1) i (6). Należy zapobiegać zranieniom lub autotomii organizmów, np. stosując do ich przenoszenia pipety z krawędziami nadtopionymi nad ogniem lub narzędzia ze stali nierdzewnej.

Kwestią, do której należy podejść krytycznie w przypadku zastosowania *L. variegatus* w badaniach bioakumulacji osadu, jest ich sposób rozmnażania (architomia, po której następuje morfalakcja). Wynikiem takiego bezpłciowego rozmnażania są dwa fragmenty, które nie pobierają pokarmu przez pewien okres do momentu regeneracji części głowy lub ogona (np. (36)(37)). Oznacza to, że w przypadku *L. variegatus* pobieranie osadu i zanieczyszczenia z pożywieniem może nie odbywać się w sposób ciągły, jak w przypadku *Tubificidae*, które nie rozmnażają się przez fragmentację.

W związku z tym w celu zminimalizowania niekontrolowanego rozmnażania i odnawiania oraz późniejszej dużej zmienności w wynikach badań, należy dokonać synchronizacji. Zmienność taka może mieć miejsce w przypadku, gdy niektóre osobniki, które uległy fragmentacji i w związku z tym nie pobierają pokarmu przez pewien okres czasu, są w mniejszym stopniu narażone na działanie badanej substancji niż inne osobniki, które nie uległy fragmentacji podczas badania np. (38). Na 10–14 dni przed rozpoczęciem narażenia, organizmy należy sztucznie podzielić (synchronizacja) (65). Należy wykorzystać duże organizmy, które nie wykazują oznak niedawnego podziału. Organizmy te można umieścić na szklanym szkiełku w kropli wody do hodowli i rozciąć w okolicy środkowej części ciała za pomocą skalpela. Należy dopilnować, aby tylne końce były podobnej długości. Tylne końce należy następnie pozostawić w celu odtworzenia nowych głów w naczyniu do hodowli zawierającym to samo podłoże, co wykorzystane w hodowli, i wodę regenerowaną aż do momentu rozpoczęcia narażenia. Oznaką regeneracji nowych

głów jest zakopywanie się zsynchronizowanych organizmów w substracie (obecność zregenerowanych głów można potwierdzić, sprawdzając reprezentatywne próbki pod dwuokularowym mikroskopem). Przewiduje się, że organizmy użyte do badań będą później w podobnym stanie fizjologicznym. Oznacza to, że jeśli podczas badania u zsynchronizowanych organizmów następuje regeneracja przez morfalaksję, praktycznie wszystkie zwierzęta będą w równym stopniu narażone na kontakt ze wzbogaconym osadem. Pierwsze karmienie zsynchronizowanych organizmów powinno zostać wykonane w momencie, gdy organizmy zaczną zakopywać się w podłożu lub 7 dni po rozcięciu. Schemat karmienia powinien wyglądać podobnie jak w przypadku zwykłych hodowli, ale zaleca się karmienie zsynchronizowanych organizmów tym samym pokarmem, które ma być wykorzystane w badaniu. Organizmy należy przechowywać w temperaturze badania wynoszącej 20 ± 2 °C. Po regeneracji w badaniu zastosować należy nienaruszone i kompletne organizmy podobnej wielkości, które pod wpływem delikatnych bodźców mechanicznych aktywnie pływają lub czołgają się. Należy zapobiegać zranieniom lub autotomii organizmów, np. stosując do ich przenoszenia pipety z krawędziami nadtopionymi nad ogniem lub narzędzia ze stali nierdzewnej.

W przypadku zastosowania w badaniu *Lumbriculus variegatus*, ze względu na specyficzny sposób rozmnażania się tego gatunku, powinien nastąpić wzrost liczby organizmów podczas badania, jeżeli warunki są sprzyjające (6). Brak rozmnażania w badaniu bioakumulacji z wykorzystaniem *L. variegatus* należy odnotować i uwzględnić podczas interpretacji wyników badania.

***Branchiura sowerbyi* (Beddard), Tubificidae, Oligochaeta (nie potwierdzone w badaniu międzylaboratoryjnym)**

Branchiura sowerbyi zamieszkują różne rodzaje osadów w zbiornikach, jeziorach, stawach i rzekach, pierwotnie w rejonach tropikalnych. Występują również w zbiornikach z ciepłą wodą półkuli północnej. Liczniej występują jednak w gliniasto-błotnych osadach o wysokiej zawartości związków organicznych. Ponadto organizmy te żyją w warstwie osadu. Nawet tylny koniec organizmów jest zazwyczaj zakopany. Gatunek ten łatwo jest zidentyfikować ze względu na listki skrzelowe znajdujące się w jego tylnej części. Osobniki dorosłe mogą osiągnąć długość 9–11 cm i mokrą masę wynoszącą 40–50 mg. Organizmy te cechują się wysokim wskaźnikiem rozrodczości, czas podwojenia populacji wynosi mniej niż 2 tygodnie w warunkach temperatury i karmienia opisanych poniżej (Aston i in., 1982, (65)). *B. sowerbyi* były stosowane zarówno w badaniach toksyczności, jak i bioakumulacji (odpowiednio Marchese i Brinkhurst 1996 (31), Roghair i in. 1996 (67)).

Metody hodowli

Streszczenie warunków hodowli gatunku *Branchiura sowerbyi* przedstawione zostało poniżej (przedłożone przez Mercedes R. Marchese, INALI, Argentyna i Carla J. Roghair, RIVM, Niderlandy).

Nie jest wymagane stosowanie jednej techniki hodowli organizmów użytych do badania. Organizmy można hodować w niezanieczyszczonym, naturalnym osadzie (31). Doświadczenie pokazuje, że pożywka składająca się z naturalnego osadu i piasku poprawia stan organizmów w porównaniu z czystym naturalnym osadem (32)(67). Do hodowli można użyć 3 zlewki w kształcie litery L, zawierające układ 1 500 ml osadu/wody, składający się z 375 ml naturalnego niezanieczyszczonego osadu (około 10 % całkowitego węgla organicznego; około 17 % cząsteczek ≤ 63 μ m), 375 ml czystego piasku (M32) oraz 750 ml regenerowanej i odchlorowanej wody wodociągowej (31)(32) (67). Jako podłoże do hodowli można również wykorzystać papierowe ręczniki, ale wzrost populacji będzie niższy niż w przypadku naturalnego osadu. W układach pół-statycznych warstwę wody w zlewce powoli napowietrza się, a wodę nadosadową należy co tydzień wymieniać.

Na początku każda zlewka zawiera 25 młodych organizmów. Po dwóch miesiącach duże organizmy wyjmuje się z osadu za pomocą pęsety i umieszcza w nowej zlewce ze świeżo sporządzoną pożywką osadu/wody. Stara zlewka zawiera również kokony i młode organizmy. W ten sposób wyhodowanych może zostać do 400 młodych organizmów na zlewkę. Dorosłe osobniki mogą być wykorzystywane do celów reprodukcyjnych przez co najmniej rok.

Temperaturę hodowli należy utrzymywać w przedziale 21–25 °C. Temperatura nie powinna się zmieniać o więcej niż ± 2 °C. Czas konieczny do rozwoju embrionalnego od złożenia jaja do opuszczenia przez młodego osobnika kokonu wynosi w przybliżeniu trzy tygodnie w temperaturze 25 °C. Liczba jaj złożonych przez jednego osobnika gatunku *B. sowerbyi* mieści się w zakresie od 6,36 (31) do 11,2 (30) w mule w temperaturze 25 °C. Liczba jaj przypadających na kokon zawiera się w przedziale 1,8–2,8 (66)(69) lub do 8 (68).

Raz w tygodniu należy mierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu, twardość wody, temperaturę i pH. Dwa lub trzy razy w tygodniu można dodać do osadu *ad libitum* pokarm dla ryb (np. TetraMin®). Organizmy można również karmić *ad libitum* rozmrożoną sałatą.

Główną zaletą tego gatunku jest wysoka indywidualna biomasa (do 40–50 mg mokrej masy na osobnika). W związku z tym gatunek ten może być wykorzystywany w badaniu bioakumulacji badanych substancji nieoznakowanych izotopowo. Może on zostać narażony w układach wykorzystywanych w przypadku *T. tubifex* lub *L. variegatus* z jednym osobnikiem na każdą kontrolę (11). Następnie należy jednak zwiększyć liczbę kontrol, chyba że stosowane są większe komory badawcze (11). Należy również dostosować do tych gatunków kryterium ważności powiązane z zakopywaniem się.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. W: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Tom 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- (2) Komisja Europejska (WE) (2003). Wskazówki techniczne w sprawie oceny ryzyka uzupełniające dyrektywę Komisji 93/67/EWG w sprawie oceny ryzyka ze strony substancji notyfikowanych, rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94 w sprawie oceny ryzyka stwarzanego przez istniejące substancje oraz dyrektywę 98/8/WE Parlamentu Europejskiego i Rady dotyczącą wprowadzania do obrotu produktów biobójczych; część I–IV. Urząd Publikacji Wspólnot Europejskich (Komisja Europejska), Luksemburg.
- (3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. Monografie OECD nr 60. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD), Paryż.
- (4) Ingersoll C.G., G.T. Ankley, D.A. Benoit, E.L. Brunson, G.A. Burton, F.J. Dwyer, R.A. Hoke, P. F. Landrum, T. J. Norberg-King i P.V. Winger. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (5) Rozdział C.13 niniejszego załącznika. Biokoncentracja: badanie ryb w warunkach przepływu.
- (6) Stany Zjednoczone EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Wyd. drugie. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marzec 2000.
- (7) Rozdział C.27 niniejszego załącznika: Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconego osadu.
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. i Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (9) Ingersoll C.G., E.L. Brunson, N. Wang, F.J. Dwyer, G.T. Ankley, D.R. Mount, J. Huckins, J. Petty i P. F. Landrum (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. i 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., J. Römbke, Th. Knacker, C. Franke i G. Studinger (1999). Warsztaty pt. »Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes«, 26–27.4.1999, Hochheim/Main, Niemcy. Sprawozdanie dotyczące projektu raportu na temat badań i rozwoju nr 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler Ph., M. Meller, H.J. Schallnaß i D. Gilberg (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. i Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. *Estuaries* 13, 301–310.
- (14) Nendza M. (1991). QSAR bioakumulacji: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. W: R. Nagel i R. Loskill (red.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Materiały z międzynarodowych warsztatów, Berlin 1990. VCH, Weinheim.
- (15) Landrum P.F., H. Lee II i M.J. Lydy (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. i Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.* 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W. i Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J. i Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (19) Franke C., G. Studinger, G. Berger, S. Böhling, U. Bruckmann, D. Cohors-Fresenborg i U. Jöhncke (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29, 1501-1514.
- (20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 23.
- (21) Stany Zjednoczone EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.
- (22) Następujące rozdziały niniejszego załącznika:
- Rozdział A.4, Prężność par
- Rozdział A.5, Napięcie powierzchniowe
- Rozdział A.6, Rozpuszczalność w wodzie
- Rozdział A.8, Współczynnik podziału, metoda wytrąsania w kolbie
- Rozdział A.24, Współczynnik podziału, wysokosprawna chromatografia cieczowa
- Rozdział C.7, Degradacja — degradacja abiotyczna: hydroliza jako funkcja pH
- Rozdział C.4 A-F, Oznaczanie szybkiej biodegradowalności
- Rozdział C.19, Oszacowanie współczynnika adsorpcji (K_{oc}) na glebie i w osadzie ściekowym przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)
- Rozdział C.29, Szybka biodegradowalność CO₂ w szczelnie zamkniętych naczyniach
- (23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Wytyczne na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny substancji chemicznych, nr 3, OECD, Paryż. OECD, Paryż.
- (24) Antoine M.D., S. Dewanathan i G. Patonay (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 i G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. W: Hutzinger, O. (editor), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2 Part J (red. tomu: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) Spacie A. i J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W. i 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. i 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. i Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) Aston R.J. i 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. i R.O. i 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. i Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. Sprawozdanie RIVM 719102027.
- (33) Rozdział C.1 niniejszego załącznika, Ryby, badanie toksyczności ostrej.
- (34) OECD (1992c). Wytyczne dotyczące badania substancji chemicznych nr 210. Badanie toksyczności na wczesnych etapach życia ryb. OECD, Paryż.
- (35) Kaster J.L., J.V. Klump, J. Meyer, J. Krezoski i M.E. Smith (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) Leppänen, M.T. i Kukkonen, J.V.K. Kukkonen 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) Leppänen, M.T. i Kukkonen, J.V.K. Kukkonen 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. i 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. 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) Rozdział C.8 niniejszego załącznika, Toksyczność dla dżdżownic.
- (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). W: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (red.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, Nowy York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów, E 1391-94.
- (45) Hooftman R.N., K. van de Guchte i C.J. Roghair (1993). (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. i 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. i 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. i Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 30, 1 099-1 105.

- (50) Bligh, E.G. i Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) De Boer J., F. Smedes, D. Wells i A. Allan (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. Unijny program norm, pomiarów i badań.
- (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. Instytut ds. Jakości Wód, Dania.
- (53) Zok S., G. Gorge, W. Kalsch, i R. Nagel (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. Praca habilitacyjna, Uniwersytet Jana Gutenberga, Moguncja, Niemcy.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries i 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. i N.M. Van Straalen (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. i 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., M.A. Farrell i R.O. Brinkhurst (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman P.M., M.A. Farrell i R.O. Brinkhurst (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. i Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. W: 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., M. Meller, H.J. Schallnaß i D. Gilberg (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. We współpracy z R. Nagel i B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. i 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. i 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*. Sprawozdanie RIVM 719101026.
- (68) Aston R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina C., A. Pasteris, G. Bonomi i D. Marzuoli (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267–274”
-

ISSN 1977-0766 (wydanie elektroniczne)
ISSN 1725-5139 (wydanie papierowe)



Urząd Publikacji Unii Europejskiej
2985 Luksemburg
LUKSEMBURG

PL