II

(Nelegislatívne akty)

NARIADENIA

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) 2016/266

zo 7. decembra 2015,

ktorým sa na účely prispôsobenia technickému pokroku mení nariadenie (ES) č. 440/2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH)

(Text s významom pre EHP)

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES ([1]), a najmä na jeho článok 13 ods. 2,

keďže:

(1) Nariadenie Komisie (ES) č. 440/2008 ([2]) obsahuje testovacie metódy na určovanie fyzikálno-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity chemikálií, ktoré sa majú používať na účely nariadenia (ES) č. 1907/2006.

(2) Nariadenie (ES) č. 440/2008 je nevyhnutné aktualizovať tak, aby zahŕňalo nové a aktualizované testovacie metódy, ktoré nedávno prijala OECD, a tým sa zohľadnil technický pokrok a zaručilo zníženie počtu zvierat používaných na pokusné účely v súlade so smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ ([3]). Tento návrh bol prekonzultovaný so zainteresovanými stranami.

(3) Prispôsobenie obsahuje 20 testovacích metód: jednu novú metódu na stanovenie fyzikálno-chemickej vlastnosti, 11 nových skúšobných metód a tri aktualizované testovacie metódy na hodnotenie ekotoxicity a päť nových testovacích metód na posúdenie osudu a správania v životnom prostredí.

(4) Nariadenie (ES) č. 440/2008 by sa preto malo zodpovedajúcim spôsobom zmeniť.

(5) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom výboru zriadeného na základe článku 133 nariadenia (ES) č. 1907/2006,

([1]) Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1.
([2]) Nariadenie Komisie (ES) č. 440/2008 z 30. mája 2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH) (Ú. v. EÚ L 142, 31.5.2008, s. 1).
([3]) Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Príloha k nariadeniu (ES) č. 440/2008 sa mení v súlade s prílohou k tomuto nariadeniu.

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť tretím dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch

V Bruseli 7. decembra 2015

Za Komisiu

predseda

Jean-Claude JUNCKER

PRÍLOHA

Príloha k nariadeniu (ES) č. 440/2008 sa mení takto:

1. Na začiatok prílohy sa pred časť A vkladá poznámka:

„Poznámka:

Pred použitím niektorej z týchto testovacích metód na testovanie viaczložkovej látky (MCS), látky neznámeho alebo premenlivého zloženia, produktu komplexnej reakcie alebo biologického materiálu (UVCB), alebo zmesi a v prípade, že sa jej použiteľnosť na testovanie MCS, UVCB alebo zmesí v príslušnej metóde neuvádza, malo by sa zvážiť, či daná metóda spĺňa stanovený regulačný účel.

Ak sa daná testovacia metóda používa na testovanie MCS, UVCB alebo zmesi, mali by byť dostupné čo najpodrobnejšie informácie o jej zložení napr. na základe chemickej identity jej zložiek, ich kvantitatívneho výskytu a príslušných vlastností zložiek.“

2. Dopĺňa sa kapitola A.24:

„A.24. **ROZDEĽOVACIA KONŠTANTA (N-OKTANOL/VODA), METÓDA VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE (HPLC)**

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 117 (2004).

1. Rozdeľovacia konštanta (P) je vymedzená ako pomer rovnovážnych koncentrácií rozpustenej látky v dvojfázovom systéme pozostávajúcom z dvoch do značnej miery nezmiešateľných rozpúšťadiel. V prípade n-oktanolu a vody platí:

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

rozdeľovacia konštanta je podielom dvoch koncentrácií; je to bezrozmerná veličina a zvyčajne sa udáva vo forme dekadického logaritmu.

2. P_{ow} je kľúčovým parametrom v štúdiách osudu chemických látok v životnom prostredí. Bol preukázaný veľmi významný vzťah medzi P_{ow} neionizovanej formy látok a ich bioakumuláciou v rybách. Ukázalo sa tiež, že P_{ow} je užitočným parametrom pri predpovedaní adsorpcie, pokiaľ ide o pôdu a sedimenty a pri stanovovaní kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity pre širokú škálu biologických účinkov.

3. Pôvodný návrh tejto testovacej metódy vychádzal z článku, ktorý napísali C. V. Eadsforth and P. Moser (1). Vývoj testovacej metódy a medzilaboratórneho porovnávacieho testu OECD koordinoval Spolkový úrad pre životné prostredie (Umweltbundesamt) Spolkovej republiky Nemecko v roku 1986 (2).

ÚVODNÉ ÚVAHY

4. Hodnoty log P_{ow} v rozsahu od − 2 do 4 (príležitostne až 5 a viac) ([1]) je možné experimentálne stanoviť metódou trepačkovej banky (kapitola A.8 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 107). Metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) sa používa pri hodnotách log P_{ow} v rozsahu od 0 do 6 [odkazy v literatúre (1), (2), (3), (4), (5)]. Táto metóda si môže vyžadovať odhad hodnoty P_{ow} na výber vhodných referenčných látok a na podopretie akýchkoľvek záverov vyvodených z údajov získaných pri teste. Výpočtové metódy sú stručne vysvetlené v dodatku k tejto testovacej metóde. Prevádzkový režim metódy HPLC je izokratický.

5. Hodnoty P_{ow} závisia od podmienok prostredia, akými sú teplota, pH, iónová sila atď., a tie by sa mali v rámci pokusu definovať, aby bolo možné dosiahnuť správny výklad údajov P_{ow}. Pre ionizovateľné látky môže byť vhodná iná metóda [napr. návrh usmernení OECD o pH-metrickej metóde pre ionizované látky (6)], ktorá by sa mohla použiť ako alternatívna metóda. Hoci tento návrh usmernení OECD môže byť dostatočne vhodný na stanovenie P_{ow} pre spomínané ionizovateľné látky, v niektorých prípadoch je vhodnejšie použiť metódu HPLC pri environmentálne relevantných hodnotách pH (pozri bod 9).

([1]) Vrchná hranica je daná potrebou dosiahnuť fázu úplného oddelenia po úpravách rozdeľovacej rovnováhy a predtým, než sa odoberú vzorky na analytické stanovenie. Ak sa táto skutočnosť nezanedbá, vrchná hranica sa môže posunúť na vyššie hodnoty P_{ow}.

PRINCÍP METÓDY

6. Metóda HPLC s reverznou fázou sa uskutočňuje na analytických kolónach naplnených komerčne dostupnou tuhou fázou obsahujúcou dlhé uhľovodíkové reťazce (napr. C8, C18), ktoré sú chemicky viazané na kremík.

7. Chemikália injektovaná na takúto kolónu sa rozdeľuje medzi pohyblivú rozpustnú fázu a uhľovodíkovú nepohyblivú fázu, keďže sa v kolóne transportuje pomocou pohyblivej fázy. Látky sa zadržiavajú proporcionálne k ich rozdeľovacej konštante medzi uhľovodíkom a vodou, pričom najskôr dochádza k elúcii hydrofilných a najneskôr lipofilných látok. Retenčný čas sa vyjadruje pomocou kapacitného faktora k, ktorý je daný vzorcom:

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

kde t_R je retenčný čas testovanej látky a t_0 je mŕtvy čas, t. j. priemerný čas, ktorý molekula rozpúšťadla potrebuje na to, aby prešla kolónou. Kvantitatívne analytické metódy sa nepožadujú a potrebné je iba stanovenie retenčných časov.

8. Rozdeľovacia konštanta oktanol/voda testovanej látky sa môže vypočítať experimentálnym stanovením jej kapacitného faktora k a dosadením hodnoty k do tejto rovnice:

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

kde

a, b sú koeficienty lineárnej regresie.

Uvedenú rovnicu je možné dosiahnuť lineárnou regresiou hodnôt dekadického logaritmu rozdeľovacích konštánt oktanol/voda referenčných látok voči hodnotám dekadického logaritmu kapacitných faktorov referenčných látok.

9. Metóda HPLC s reverznou fázou umožňuje odhad rozdeľovacích konštánt v rozsahu hodnôt log P_{ow} od 0 do 6, ale vo výnimočných prípadoch sa tento rozsah môže rozšíriť aj na hodnoty log P_{ow} od 6 do 10. To si môže vyžadovať úpravu pohyblivej fázy (3). Metódu nie je možné použiť v prípade silných kyselín a zásad, polymetalických látok, látok, ktoré reagujú s eluentom, alebo povrchovo aktívnych látok. Merania na ionizovateľných látkach v ich neionizovanej forme (voľná kyselina alebo voľná zásada) sa môžu vykonať len s použitím vhodného tlmivého roztoku s hodnotou pH nižšou ako pK_a pre voľnú kyselinu alebo vyššou ako pK_a pre voľnú zásadu. Ak je dostupná, môže sa ako alternatíva (6) použiť pH-metrická metóda na testovanie ionizovateľných látok (6). Ak sa hodnota log P_{ow} stanovuje na účely klasifikácie nebezpečnosti pre životné prostredie alebo posudzovania environmentálneho rizika, test by sa mal vykonať v rozsahu hodnôt pH relevantnom pre prírodné prostredie, t. j. pre hodnoty pH v rozsahu od 5,0 do 9.

10. V niektorých prípadoch môžu prímesi skomplikovať interpretáciu výsledkov v dôsledku neistoty vrcholovej špecifikácie. V prípade zmesí, ktoré vykazujú nerozpustené pásmo, je potrebné uviesť horné a dolné hraničné hodnoty log P_{ow}, ako aj percentuálny podiel plochy každého píku log P_{ow}. V prípade zmesí, ktoré predstavujú skupinu homológov, by sa mala uviesť aj vážená priemerná hodnota log P_{ow} (7), vypočítaná na základe jednotlivých hodnôt P_{ow} a zodpovedajúcich percentuálnych podielov plochy (8). Pri výpočte by sa mali vziať do úvahy všetky píky, ktorých podiel na celkovej ploche píku dosahuje hodnotu 5 % alebo viac (9):

$$\textit{vážený priemer} \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\textit{plocha}\,\%)}{\textit{celková plocha píku}\,\%} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\textit{plocha}\,\%_i)}{\sum_i \textit{plocha}\,\%}$$

Vážená priemerná hodnota log P_{ow} je platná len pre látky alebo zmesi (napr. talové oleje) pozostávajúce z homológov (napr. série alkánov). V prípade zmesí sa môžu dosiahnuť zmysluplné výsledky merania za predpokladu, že použitý analytický detektor má rovnakú citlivosť na všetky látky v zmesi a tie je možné primerane rozlíšiť.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

11. Pred použitím danej metódy by mala byť známa disociačná konštanta, štruktúrny vzorec a rozpustnosť v pohyblivej fáze. Užitočné môžu byť aj informácie o hydrolýze.

KRITÉRIÁ KVALITY

12. S cieľom zvýšiť dôveryhodnosť merania sa hodnoty musia stanoviť dvakrát.

— Opakovateľnosť: hodnoty log P_{ow} získané z opakovaných meraní vykonaných za rovnakých podmienok a s použitím rovnakého súboru referenčných látok by mali byť v rozsahu ± 0,1 log jednotiek.

— Reprodukovateľnosť: ak sa merania zopakujú s iným súborom referenčných látok, výsledky sa môžu líšiť. Korelačný koeficient R pre vzťah medzi log k a log P_{ow} pre súbor testovaných látok dosahuje spravidla hodnotu približne 0,9, čo zodpovedá rozdeľovacej konštante oktanol/voda log P_{ow} ± 0,5 log jednotiek.

13. Medzilaboratórny porovnávací test ukázal, že pomocou metódy HPLC je možné získať hodnoty log P_{ow} v rozsahu ± 0,5 jednotiek z hodnôt získaných pomocou metódy trepačkovej banky (2). Ďalšie porovnania je možné nájsť v literatúre pod číslami (4) (5) (10) (11) (12). Najpresnejšie výsledky poskytujú korelačné krivky založené na štrukturálne príbuzných referenčných látkach (13).

REFERENČNÉ LÁTKY

14. Na účely korelácie nameranej hodnoty kapacitného faktora k látky s jej hodnotou P_{ow} je potrebné vytvoriť kalibračnú krivku pomocou najmenej šiestich bodov (pozri bod 24). Je na používateľovi, aby si zvolil vhodné referenčné látky. Hodnota log P_{ow} testovanej látky by mala byť spravidla v rozsahu hodnôt log P_{ow} referenčných látok, t. j. najmenej jedna referenčná látka by mala mať hodnotu P_{ow} vyššiu než testovaná látka a iná zasa hodnotu P_{ow} nižšiu než testovaná látka. Extrapolácia by sa mala použiť iba vo výnimočných prípadoch. Uprednostňovať by sa mali referenčné látky, ktoré sú štrukturálne príbuzné s testovanou látkou. Hodnoty log P_{ow} referenčných látok, ktoré sa používajú na kalibráciu, by mali byť založené na spoľahlivých experimentálnych údajoch. V prípade látok s vysokou hodnotou log P_{ow} (obyčajne viac ako 4) sa môžu používať vypočítané hodnoty, ak nie sú k dispozícii spoľahlivé experimentálne údaje. Ak sa použijú extrapolované hodnoty, je potrebné uviesť hraničnú hodnotu.

15. Pre mnohé skupiny chemikálií existujú rozsiahle zoznamy hodnôt log P_{ow} (14) (15). Ak údaje týkajúce sa rozdeľovacích konštánt štrukturálne príbuzných látok nie sú dostupné, je možné použiť všeobecnejšiu kalibráciu vykonanú s inými referenčnými látkami. Odporúčané referenčné látky a ich hodnoty P_{ow} sú uvedené v tabuľke 1. V prípade ionizovateľných látok platia dané hodnoty pre ich neionizovanú formu. Hodnovernosť a kvalita uvedených údajov boli skontrolované v rámci medzilaboratórneho porovnávacieho testu.

Tabuľka 1

Odporúčané referenčné látky

	Číslo CAS	Referenčná látka	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-butanón (metyletylketón)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetylpyridín	0,5	
3	62-53-3	anilín	0,9	
4	103-84-4	acetanilid	1,0	
5	100-51-6	benzylakohol	1,1	
6	150-76-5	4-metoxyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	kyselina fenoxyoctová	1,4	pKa = 3,12

	Číslo CAS	Referenčná látka	log P_{ow}	pKa
8	108-95-2	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	benzonitril	1,6	
11	140-29-4	fenylacetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-metylbenzylalkohol	1,6	
13	98-86-2	acetofenón	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	kyselina 3-nitrobenzoová	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-chlóranilín	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	nitrobenzén	1,9	
18	104-54-1	(*E*)-fenylprop-2-én-1-ol (škoricový alkohol)	1,9	
19	65-85-0	kyselina benzoová	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	*p*-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (*trans*)	kyselina škoricová	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	anizol	2,1	
23	93-58-3	metylbenzoát	2,1	
24	71-43-2	benzén	2,1	
25	99-04-7	kyselina 3-metylbenzoová	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-chlórfenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	trichlóretylén	2,4	
28	1912-24-9	atrazín	2,6	
29	93-89-0	etyl-benzoát	2,6	
30	1194-65-6	2,6-dichlórbenzonitril	2,6	
31	535-80-8	kyselina 3-chlórbenzoová	2,7	pKa = 3,82

	Číslo CAS	Referenčná látka	log P_{ow}	pKa
32	108-88-3	toluén	2,7	
33	90-15-3	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dichlóranilín	2,8	
35	108-90-7	chlórbenzén	2,8	
36	1746-13-0	alyl(fenyl)éter	2,9	
37	108-86-1	brómbenzén	3,0	
38	100-41-4	etylbenzén	3,2	
39	119-61-9	benzofenón	3,2	
40	92-69-3	4-fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	tymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-dichlórbenzén	3,4	
43	122-39-4	difenylamín	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	naftalén	3,6	
45	93-99-2	fenyl-benzoát	3,6	
46	98-82-8	izopropylbenzén	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trichlórfenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	bifenyl	4,0	
49	120-51-4	benzyl-benzoát	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-*sek*-butylfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-trichlórbenzén	4,2	
52	143-07-7	kyselina dodekánová	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	(difenyl)éter	4,2	
54	85-01-8	fenantrén	4,5	
55	104-51-8	*n*-butylbenzén	4,6	

	Číslo CAS	Referenčná látka	log P_{ow}	pKa
56	103-29-7	dibenzyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenylpyridín	4,9	
58	206-44-0	fluorantén	5,1	
59	603-34-9	trifenylamín	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

OPIS METÓDY

Predbežný odhad rozdeľovacej konštanty

16. Uprednostňuje sa odhad rozdeľovacej konštanty použitím výpočtovej metódy (pozri dodatok), alebo kde je to vhodné, na základe pomeru rozpustností testovanej látky v čistých rozpúšťadlách.

Zariadenie

17. Požaduje sa kvapalinový chromatograf vybavený nízkoimpulzným čerpadlom a vhodným detekčným systémom. Na širokú škálu chemických skupín je možné uplatniť UV detektor, ktorý využíva vlnovú dĺžku 210 nm, alebo refraktometrický (RI) detektor. Prítomnosť polárnych skupín v nepohyblivej fáze môže vážne narušiť fungovanie kolóny vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Preto by mali nepohyblivé fázy obsahovať minimálny podiel polárnych skupín (16). Je možné použiť aj komerčné mikročasticové náplne s reverznou fázou alebo kolóny s hotovou náplňou. Medzi vstrekovací systém a analytickú kolónu sa môže umiestniť ochranná kolóna.

Pohyblivá fáza

18. Na prípravu eluačného rozpúšťadla, ktoré treba pred použitím odplyniť, sa používa metanol kvalitatívnej triedy HPLC a destilovaná alebo deionizovaná voda. Mala by sa použiť izokratická elúcia. Použiť treba pomery metanolu a vody s minimálnym obsahom vody 25 %. Na elúciu látok s hodnotou log P rovnajúcou sa hodnote 6 v priebehu jednej hodiny pri prietoku 1 ml za minútu spravidla postačí pomer zmesi metanolu a vody 3:1 (objemový zlomok). Pre látky s hodnotou log P vyššou ako 6 môže byť potrebné skrátiť čas elúcie (ako aj časy referenčných látok) znížením polarity pohyblivej fázy alebo skrátením dĺžky kolóny.

19. Testovaná látka a referenčné látky musia byť rozpustné v pohyblivej fáze v dostatočných koncentráciách, aby sa umožnila ich detekcia. Iba vo výnimočných prípadoch sa môžu so zmesou metanolu a vody použiť aj aditíva, keďže menia vlastnosti kolóny. V týchto prípadoch musí byť potvrdené, že retenčné časy testovanej látky a referenčných látok nie sú ovplyvnené. Ak zmes metanolu a vody nie je vhodná, môžu sa použiť iné zmesi organického rozpúšťadla a vody, napríklad zmes etanolu a vody, acetonitrilu a vody alebo izopropylalkoholu (2-propanolu) a vody.

20. Hodnota pH eluentu je kritická pre ionizovateľné látky. Táto hodnota by mala byť v prevádzkovom rozsahu pH kolóny, ktorý je spravidla od 2 do 8. Odporúča sa pufrovanie. Treba dbať na to, aby sa zabránilo zrážaniu solí a poškodeniu kolóny, ku ktorým dochádza v prípade použitia niektorých organických zmesí fázy a pufra. Merania metódou HPLC s nepohyblivými fázami na báze kremíka s hodnotami pH nad 8 sa spravidla neodporúčajú, lebo použitie alkalickej pohyblivej fázy môže zapríčiniť rýchle poškodenie funkčnosti kolóny.

Rozpustené látky

21. Testované a referenčné látky musia byť dostatočne čisté, aby bolo možné priradiť jednotlivé píky v chromatogramoch príslušným látkam. Ak je to možné, mali by byť látky určené na použitie v rámci testu alebo kalibrácie rozpustené v pohyblivej fáze. Ak sa na rozpustenie testovaných a referenčných látok používa iné rozpúšťadlo ako mobilná fáza, mala by sa mobilná fáza použiť na konečné zriedenie pred vstreknutím.

Podmienky testu

22. Teplota počas merania by sa nemala meniť o viac ako ± 1 °C.

Stanovenie mŕtveho času t_0

23. Mŕtvy čas t_0 sa môže merať použitím nezadržaných organických látok (napr. tiomočoviny alebo formamidu). Presnejšie je možné mŕtvy čas odvodiť z nameraných retenčných časov alebo zo súboru približne siedmich členov homologického radu (napr. *n*-alkylmetylových ketónov) (17) Retenčné časy t_R (n_C + 1) sú graficky znázornené v diagrame ako funkcia t_R (n_C), kde n_C je počet atómov uhlíka. Vznikne priamka t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 − A)t_0, kde hodnota A, ktorá predstavuje vzorec k (n_C + 1)/k (n_C), je konštantná. Mŕtvy čas t_0 sa získa z úseku priamky (1 − A)t_0 a sklonu A.

Regresná rovnica

24. Ďalším krokom postupu je zostrojenie korelačného diagramu hodnôt log k v závislosti od hodnôt log P pre vhodné referenčné látky s hodnotami log P blízkymi očakávanej hodnote log P testovanej látky. V praxi sa súčasne vstrekne 6 až 10 referenčných látok. Stanoví sa retenčný čas, podľa možnosti na záznamovej integračnej jednotke napojenej na detekčný systém. Zodpovedajúce logaritmy kapacitných faktorov log k sa nanesú do diagramu ako funkcia log P. Regresný výpočet sa vykonáva v pravidelných časových intervaloch, najmenej raz denne, aby sa tak dali vziať do úvahy možné zmeny v činnosti kolóny.

STANOVENIE P_{OW} TESTOVANEJ LÁTKY

25. Testovaná látka sa vstrekuje v najmenších zistiteľných množstvách. Retenčný čas sa stanovuje dvakrát. Rozdeľovacia konštanta testovanej látky sa získa interpoláciou vypočítaného kapacitného faktora na kalibračnej krivke. Pre veľmi nízke a veľmi vysoké rozdeľovacie konštanty je potrebná extrapolácia. Najmä v týchto prípadoch sa musí venovať pozornosť hraniciam spoľahlivosti regresnej priamky. Ak je retenčný čas vzorky mimo rozsahu retenčných časov zistených pre normy, mala by sa uviesť hraničná hodnota.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Protokol o skúške

26. Protokol musí obsahovať tieto údaje:

— odhadnuté hodnoty rozdeľovacej konštanty a použitú metódu, ak sa stanoví predbežný odhad rozdeľovacej konštanty a úplný opis metódy vrátane identifikácie databázy a podrobných informácií o výbere fragmentov, ak sa použije výpočtová metóda,

— testované a referenčné látky: čistotu, štrukturálny vzorec a číslo CAS,

— opis zariadenia a prevádzkových podmienok: analytická kolóna, ochranná kolóna (predkolóna),

— pohyblivú fázu, spôsob detekcie, rozsah teplôt, pH,

— elučné profily (chromatogramy),

— mŕtvy čas a spôsob, akým sa meral,

— retenčné údaje a hodnoty log P_{ow} z odbornej literatúry pre referenčné látky použité v rámci kalibrácie,

— podrobnosti o zodpovedajúcej regresnej priamke (hodnoty log k v závislosti od hodnôt log P_{ow}) a korelačný koeficient priamky vrátane intervalov spoľahlivosti,

— priemerné retenčné údaje a interpolovanú hodnotu log P_{ow} pre testovanú látku,

— v prípade zmesi: chromatogram elučného profilu s uvedenými hraničnými hodnotami,

— hodnoty log P_{ow} vzťahujúce sa na percentuálny podiel plochy píku log P_{ow},

— výpočet pomocou regresnej priamky,

— v prípade potreby vypočítané vážené priemerné hodnoty log P_{ow}.

LITERATÚRA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dodatok

Metódy výpočtu P_{ow}

ÚVOD

1. Tento dodatok obsahuje krátky úvod k výpočtu P_{ow}. Ďalšie informácie sú k dispozícii v príručkách uvedených v literatúre pod číslami (1) (2).

2. Vypočítané hodnoty P_{ow} sa používajú pri:

— rozhodovaní o tom, ktorú experimentálnu metódu použiť: buď metódu trepačkovej banky pre hodnoty log P_{ow} v rozsahu od – 2 do 4, alebo metódu HPLC pre hodnoty log P_{ow} v rozsahu od 0 do 6,

— výbere podmienok použitia metódy HPLC (referenčné látky, pomer metanol/voda),

— kontrole hodnovernosti hodnôt získaných pomocou experimentálnych metód,

— stanovení odhadu, kedy sa nemôžu uplatniť experimentálne metódy.

Princíp výpočtových metód

3. Všetky výpočtové metódy sú založené na teoretickom trieštení molekuly na vhodné subštruktúry, pre ktoré sú známe spoľahlivé prírastky hodnoty log P_{ow}. Hodnota log P_{ow} sa potom vypočíta ako súčet jej čiastkových hodnôt a korekčných členov pre vnútromolekulové interakcie. Zoznamy fragmentových konštánt a korekčných členov sú k dispozícii v literatúre pod číslami (1) (2) (3) (4) (5) (6). Niektoré z nich sa pravidelne aktualizujú (3).

Spoľahlivosť vypočítaných hodnôt

4. Spoľahlivosť výpočtovej metódy vo všeobecnosti klesá s narastajúcou komplexnosťou skúmanej látky. V prípade jednoduchých molekúl s nízkou molekulovou hmotnosťou a jednej alebo dvoch funkčných skupín je možné predpokladať odchýlku 0,1 – 0,3 jednotiek log P_{ow} medzi výsledkami rozličných fragmentačných metód a nameranými hodnotami. Hranica chyby bude závisieť od spoľahlivosti použitých fragmentových konštánt, schopnosti rozoznať vnútromolekulové interakcie (napr. vodíkové väzby) a správneho použitia korekčných členov. V prípade ionizujúcich látok je potrebné zohľadniť náboj a stupeň ionizácie (10).

Fujitova-Hanschova πmetóda

5. Hydrofóbna substituenčná konštanta π, ktorú pôvodne zaviedol Fujita a kol. (7) ako:

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

kde PhX predstavuje aromatický derivát a PhH východiskovú látku.

$$\text{napr.}\quad ^{\pi}Cl = \log P_{ow}\,(C6H5Cl) - \log P_{ow}\,(C6H6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$$

Metóda π (π-metóda) je použiteľná predovšetkým pre aromatické látky. K dispozícii sú hodnoty π pre veľký počet substituentov (4) (5).

Rekkerova metóda

6. Pomocou Rekkerovej metódy (8) sa hodnota log P_{ow} vypočíta takto:

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

kde a_i predstavuje počet prípadov výskytu daného fragmentu v molekule a fi prírastok hodnoty log P_{ow} fragmentu. Interakčné členy môžu byť vyjadrené ako integrálny (celý) násobok jednej jedinej konštanty C_m (tzv. ‚magickej konštanty'). Fragmentové konštanty f_i a C_m boli stanovené zo zoznamu 1 054 experimentálnych hodnôt P_{ow} 825 látok použitím zloženej regresnej analýzy (6) (8). Interakčné členy sa určujú podľa stanovených pravidiel (6) (8) (9).

Hanschova-Leova metóda

7. Pomocou Hanschovej a Leovej metódy (4) sa hodnota log P_{ow} vypočíta takto:

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

kde f_i predstavuje fragmentovú konštantu, F_j korekčný člen (faktor), a_i a b_j príslušné frekvencie výskytu. Zoznamy atómových a skupinových fragmentových hodnôt a korekčných členov F_j boli odvodené metódou pokusov a chýb z experimentálnych hodnôt P_{ow}. Korekčné členy boli rozdelené do niekoľkých rozdielnych tried (1) (4). Na zohľadnenie všetkých pravidiel a korekčných členov boli vypracované softvérové balíky (3).

KOMBINOVANÁ METÓDA

8. Výpočet hodnoty log P_{ow} komplexných molekúl je možné do značnej miery zdokonaliť, ak sa molekula rozdelí na väčšie subštruktúry, pre ktoré sú k dispozícii spoľahlivé hodnoty log P_{ow}, a to buď z tabuliek (3) (4), alebo z existujúcich meraní. Takéto fragmenty (napr. heterocykly, antrachinón, azobenzén) sa potom môžu kombinovať s Hanschovými hodnotami π, prípadne s Rekkerovými alebo Leovými fragmentovými konštantami.

Poznámky

i) Výpočtové metódy je možné použiť iba pre čiastočne alebo úplne ionizované látky, keď sa zohľadnia potrebné korekčné faktory.

ii) Ak je možné predpokladať existenciu vnútromolekulových vodíkových väzieb, je potrebné prirátať zodpovedajúce korekčné členy (približne + 0,6 až + 1,0 jednotiek log P_{ow}) (1). Indikácie týkajúce sa prítomnosti takýchto väzieb je možné získať zo stereomodelov alebo zo spektroskopických údajov.

iii) Ak sú možné viaceré tautomérne formy, za základ výpočtu by sa mala použiť najpravdepodobnejšia forma.

iv) Je potrebné pozorne sledovať všetky revízie zoznamov fragmentových konštánt.

LITERATÚRA K VÝPOČTOVÝM METÓDAM

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(3) Kapitola C.11 sa nahrádza takto:

„C.3. **SLADKOVODNÉ RIASY A SINICE, TEST INHIBÍCIE RASTU**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 201 (2006, príloha upravená v roku 2011). Zistila sa potreba rozšíriť testovaciu metódu tak, aby zahŕňala ďalšie druhy, a aktualizovať ju s cieľom splniť požiadavky týkajúce sa hodnotenia nebezpečnosti a klasifikácie chemikálií. Táto revízia sa uskutočnila na základe rozsiahlych praktických skúseností, vedeckého pokroku v oblasti štúdií toxicity rias a rozsiahleho regulačného využitia, ku ktorému došlo od pôvodného prijatia metódy.

2. Vymedzenie použitých pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

3. Účelom tohto testu je stanoviť účinky chemikálie na rast sladkovodných mikrorias a/alebo siníc. Exponenciálne rastúce testované organizmy sú vystavené testovanej chemikálii v jednorazových kultúrach zvyčajne počas 72 hodín. Napriek pomerne krátkej dĺžke testu sa môžu hodnotiť účinky na niekoľkých generáciách.

4. Reakciou systému je zníženie rastu v sérii kultúr rias (testovacie jednotky) vystavených rôznym koncentráciám testovanej chemikálie. Reakcia sa hodnotí ako funkcia expozičnej koncentrácie v porovnaní s priemerným rastom replikovaných, nevystavených kontrolných kultúr. Na preukázanie úplnej reakcie systému na toxické účinky (optimálna citlivosť) sa kultúram umožní neobmedzený exponenciálny rast v podmienkach s vhodnými živinami a nepretržitým svetlom v čase postačujúcom na meranie zníženia špecifickej rýchlosti rastu.

5. Rast a inhibícia rastu sa kvantifikujú meraním množstva biomasy rias ako funkcie času. Biomasa rias je vymedzená ako sušina na objem, napríklad mg rias/liter testovacieho roztoku. Suchá hmotnosť sa však zložito meria, a preto sa používajú náhradné parametre. Z týchto náhradných parametrov sa najčastejšie používa počet buniek. Iné náhradné parametre zahŕňajú objem buniek, fluorescenciu, optickú hustotu atď. Je potrebné poznať prepočítavací koeficient medzi meraným náhradným parametrom a množstvom biomasy.

6. Konečným bodom testu je inhibícia rastu vyjadrená ako logaritmický nárast množstva biomasy (priemerná špecifická rýchlosť rastu) počas expozície. Z priemerných hodnôt špecifickej rýchlosti rastu zaznamenaných v sérii testovacích roztokov sa stanoví koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu rýchlosti rastu (napr. 50 %), a vyjadrí sa ako E_rC_x (napr. E_rC_{50}).

7. Ďalšou závislou premennou použitou v tejto testovacej metóde je výťažok, ktorý sa v niektorých krajinách môže vyžadovať na splnenie špecifických regulačných požiadaviek. Vymedzený je ako rozdiel množstva biomasy na konci expozície a množstva biomasy na jej začiatku. Z výťažku zaznamenaného v sérii testovacích roztokov sa vypočíta koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu výťažku (napr. 50 %), a vyjadrí sa ako E_yC_x (napr. E_yC_{50}).

8. Okrem toho je možné štatisticky stanoviť najnižšiu koncentráciu s pozorovaným účinkom (LOEC), ako aj koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

9. Informácie o testovanej chemikálii, ktoré môžu byť užitočné pri stanovovaní testovacích podmienok, zahŕňajú štrukturálny vzorec, čistotu, svetelnú stálosť, stabilitu pri podmienkach testu, vlastnosti týkajúce sa absorpcie svetla, pKa a výsledky štúdií transformácie vrátane biodegradovateľnosti vo vode.

10. Známa by mala byť rozpustnosť vo vode, rozdeľovacia konštanta oktanol/voda (P_{ow}) a tlak pary testovanej chemikálie a k dispozícii by mala byť overená metóda kvantifikácie chemikálie v testovacích roztokoch so zaznamenanou výťažnosťou a detekčným limitom.

PLATNOSŤ TESTU

11. Test je platný, ak sú splnené tieto kritériá:

— Množstvo biomasy v kontrolných kultúrach by sa malo exponenciálne zvýšiť minimálne o faktor 16 počas 72 hodinového testu. To zodpovedá špecifickej rýchlosti rastu 0,92 $deň^{-1}$. V prípade najčastejšie používaných druhov je rýchlosť rastu zvyčajne podstatne vyššia (pozri dodatok 2). Toto kritérium sa nemusí splniť, ak sa používajú druhy, ktoré rastú pomalšie než druhy uvedené v dodatku 2. V tomto prípade by sa trvanie testu malo predĺžiť, aby sa dosiahol minimálne 16-násobný rast v kontrolných kultúrach, pričom počas trvania testu musí byť rast exponenciálny. Trvanie testu sa môže skrátiť najmenej na 48 hodín, aby sa zachoval neobmedzený exponenciálny rast počas testu, pokiaľ sa dosiahne minimálny multiplikačný faktor 16.

— Priemerný variačný koeficient pre špecifické fázové rýchlosti rastu (0. – 1. deň, 1. – 2. deň a 2. – 3. deň pre 72 hodinové testy) v kontrolných kultúrach (pozri dodatok 1 pod označením ‚variačný koeficient') nesmie byť väčší ako 35 % Postup výpočtu špecifickej rýchlosti rastu po častiach je uvedený v bode 49. Toto kritérium platí pre strednú hodnotu variačných koeficientov vypočítanú pre replikáty kontrolných kultúr.

— Koeficient odchýlky priemerných špecifických rýchlostí rastu počas celého testu v paralelných kontrolných kultúrach nesmie byť väčší ako 7 % v testoch s druhmi *Pseudokirchneriella subcapitata* a *Desmodesmus subspicatus*. Pre iné druhy, zriedkavejšie používané na testovanie, nesmie hodnota presiahnuť 10 %.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

12. Referenčné chemikálie, ako napríklad 3,5-dichlórfenol, používané v medzinárodnej porovnávacej skúške (1) sa môžu testovať ako prostriedok kontroly postupu testu. Pre zelené riasy sa môže použiť ako referenčná chemikália aj dichróman draselný. Referenčnú chemikáliu je potrebné testovať najmenej dvakrát do roka.

POUŽITEĽNOSŤ TESTU

13. Táto testovacia metóda sa najľahšie používa pre chemikálie rozpustné vo vode, pri ktorých je pravdepodobné, že v podmienkach testu zostanú vo vode. V prípade testovania chemikálií, ktoré sú prchavé, silne sa adsorbujú, sú sfarbené, s nízkou rozpustnosťou vo vode, alebo chemikálií, ktoré môžu ovplyvniť dostupnosť živín alebo minerálnych látok v testovacom médiu, môžu byť potrebné určité modifikácie uvedeného postupu (napr. uzatvorený systém, úprava testovacích nádob). Usmernenia k niektorým vhodným úpravám sú uvedené v literatúre pod číslami (2) (3) a (4).

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Zariadenie

14. Testovacie nádoby a ostatné zariadenia, ktoré prichádzajú do styku s testovacími roztokmi, by mali byť celé vyrobené zo skla alebo z iného chemicky inertného materiálu. Predmety by sa mali dôkladne umyť, aby sa zabezpečilo, že žiadne organické ani anorganické kontaminanty neovplyvnia rast rias ani zloženie testovacích roztokov.

15. Testovacími nádobami sú spravidla sklené banky s rozmermi, ktoré umožňujú dostačujúci objem kultúry pre merania počas testu a prenos dostatočného množstva CO_2 z atmosféry (pozri bod 30). Treba si uvedomiť, že objem kvapaliny musí byť postačujúci pre analytické stanovenia (pozri bod 37).

16. Okrem toho môžu byť potrebné niektoré z týchto zariadení alebo všetky tieto zariadenia:

— zariadenie na kultiváciu: odporúča sa nádoba alebo komora, v ktorej sa môže udržiavať zvolená inkubačná teplota s presnosťou ± 2 °C,

— prístroje na meranie svetla: je dôležité si uvedomiť, že metóda merania svietivosti a najmä typ receptora (kolektora) môže ovplyvniť nameranú hodnotu. Merania by sa mali prednostne vykonávať s použitím guľového (4 π) receptora (ktorý reaguje na priame a odrazené svetlo zo všetkých uhlov nad a pod rovinou merania) alebo 2 π receptora (ktorý reaguje na svetlo zo všetkých uhlov nad rovinou merania).

— Zariadenie na stanovenie množstva biomasy rias. Počet buniek, ktorý je najčastejšie používaným náhradným parametrom za biomasu rias, sa môže stanoviť s použitím elektronického počítadla častíc, mikroskopu s počítacou komorou alebo prietokového cytometra. Iné náhradné parametre za biomasu je možné merať použitím prietokového cytometra, fluorimetra, spektrofotometra alebo kolorimetra. Na výpočet je potrebný prepočítavací faktor vzťahujúci sa na počet buniek na sušinu. Na zabezpečenie potrebných meraní pri nízkych koncentráciách biomasy s použitím spektrofotometra môže byť potrebné použiť kyvety s dráhou svetla minimálne 4 cm.

Testované organizmy

17. Môžu sa použiť viaceré druhy voľne rastúcich mikrorias a siníc. Ukázalo sa, že kmene uvedené v dodatku 2 sú vhodné pre postup testovania uvedený v tejto testovacej metóde.

18. V prípade použitia iných druhov je potrebné uviesť v skúšobnom protokole kmeň a/alebo pôvod. Treba potvrdiť, že exponenciálny rast zvolenej testovanej riasy sa môže zachovať počas testu za obvyklých podmienok.

Rastové médium

19. Odporúčajú sa dve alternatívne rastové médiá – médium OECD a AAP. Zloženie týchto médií je uvedené v dodatku 3. Treba si uvedomiť, že počiatočná hodnota pH a tlmivá kapacita (ktorá reguluje zvyšovanie pH) dvoch médií je odlišná. Preto môžu byť výsledky testov rozdielne v závislosti od použitého média, najmä ak sa testujú ionizujúce chemikálie.

20. Na určité účely môže byť potrebné modifikovať rastové médium, napríklad ak sa testujú kovy a chelatačné činidlá, alebo v prípade testovania pri rôznych hodnotách pH. Použitie modifikovaného média by sa malo podrobne opísať a odôvodniť (3) (4).

Počiatočná koncentrácia biomasy

21. Počiatočné množstvo biomasy v testovacích kultúrach musí byť rovnaké vo všetkých testovacích kultúrach a dostatočne nízke, aby umožnilo exponenciálny rast počas inkubácie bez rizika vyčerpania živín. Počiatočné množstvo biomasy by nemalo byť vyššie ako 0,5 mg/l, vyjadrené ako sušina. Odporúčajú sa tieto počiatočné koncentrácie buniek:

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

Koncentrácie testovanej chemikálie

22. Rozsah koncentrácií, v ktorých sa môžu účinky prejaviť, je možné stanoviť na základe výsledkov testov na vyhľadávanie rozsahu. Pre konečný definitívny test by sa malo zvoliť minimálne päť koncentrácií usporiadaných v geometrickom rade s faktorom maximálne 3,2. Pre testované chemikálie vykazujúce plochú krivku závislosti veličiny od koncentrácie sa môže zvoliť vyšší faktor. Séria koncentrácií by mala prednostne pokrývať rozsah 5 – 75 % inhibície rýchlosti rastu rias.

Replikáty a kontrolné kultúry

23. Test by sa mal vykonať s tromi replikátmi pri každej testovacej koncentrácii. Ak sa nevyžaduje stanovenie koncentrácie NOEC, môže sa test pozmeniť zvýšením počtu koncentrácií a znížením počtu replikátov na koncentráciu. Musia existovať minimálne tri kontrolné replikáty a teoreticky by sa mal použiť dvojnásobný počet replikátov pre každú testovaciu koncentráciu.

24. Pripraviť sa môže osobitný súbor testovacích roztokov na analytické stanovenie koncentrácie testovaných chemikálií (pozri body 36 a 38).

25. Ak sa na rozpustenie testovanej chemikálie používa rozpúšťadlo, musia sa do koncepcie testu zahrnúť ďalšie kontrolné kultúry obsahujúce rozpúšťadlo v rovnakej koncentrácii, aká sa používa v testovacích kultúrach.

Príprava inokula

26. Na prispôsobenie testovacích rias podmienkam skúšky, ako aj na zabezpečenie toho, aby sa riasy nachádzali v exponenciálnej fáze rastu v čase ich použitia na inokuláciu testovacích roztokov, sa pripraví inokulum v testovacom médiu 2 až 4 dni pred začiatkom skúšky. Biomasa rias by sa mala upraviť tak, aby sa v inokule umožnil exponenciálny rast do začiatku skúšky. Inokulum sa inkubuje za rovnakých podmienok ako testovacie kultúry. V inokule sa meria nárast množstva biomasy, aby sa zabezpečilo, že rast je v obvyklom rozsahu ako v prípade testovacieho kmeňa za podmienok kultivácie. Príklad postupu kultivácie rias je opísaný v dodatku 4. S cieľom zabrániť synchrónnemu deleniu buniek počas skúšky môže byť potrebný druhý stupeň množenia inokula.

Príprava testovacích roztokov

27. Všetky testovacie roztoky musia obsahovať rovnaké koncentrácie rastového média a počiatočného množstva biomasy testovanej riasy. Testovacie roztoky zvolených koncentrácií sa zvyčajne pripravujú zmiešaním zásobného roztoku testovanej chemikálie s rastovým médiom a inokulom. Zásobné roztoky sa spravidla pripravujú rozpustením chemikálie v testovacom médiu.

28. Rozpúšťadlá, napríklad acetón, *t*-butyl, alkohol a dimetylformamid, sa môžu použiť ako nosiče na pridávanie chemikálií s nízkou rozpustnosťou vo vode do testovacieho média (2) (3). Koncentrácia rozpúšťadla by nemala byť vyššia ako 100 µl/l a rovnaká koncentrácia rozpúšťadla by sa mala pridať do všetkých kultúr (vrátane kontrolných) v testovacej sérii.

Inkubácia

29. Testovacie nádoby sa uzavrú zátkami prepúšťajúcimi vzduch. Nádoby sa pretrepú a umiestnia do zariadenia na kultiváciu. Počas testu je potrebné ponechať riasy v suspenzii a umožniť prenos CO_2. Preto je potrebné nepretržité trepanie alebo miešanie. Kultúry by sa mali udržiavať pri teplote v rozsahu od 21 do 24 °C, s kontrolovanou presnosťou ± 2 °C. Pre iné druhy ako tie, ktoré sú uvedené v dodatku 2, napríklad tropické druhy, môžu byť vhodné vyššie teploty za predpokladu, že je možné splniť kritériá platnosti. Odporúča sa umiestniť banky náhodne a denne ich v inkubátore premiestňovať.

30. Počas testu by sa hodnota pH kontrolného média nemala zvýšiť o viac ako 1,5 jednotiek. Pre kovy a chemikálie, ktoré sa čiastočne ionizujú pri pH blízkom testovacej hodnote pH, môže byť potrebné limitovať kolísanie pH, aby sa získali reprodukovateľné a jednoznačné výsledky. Odchýlka < 0,5 pH je technicky možná a je možné ju dosiahnuť zabezpečením prísunu dostatočného množstva CO_2 z okolitého vzduchu do testovacieho roztoku napr. zvýšením rýchlosti trepania. Ďalšou možnosťou je znížiť spotrebu CO_2 znížením počiatočného množstva biomasy alebo skrátením dĺžky testu.

31. Priestor, kde sa kultúry inkubujú, by mal byť sústavne osvetlený rovnomerným fluorescenčným osvetlením napr. studeným bielym svetlom alebo denným svetlom. Kmene rias a siníc majú odlišné požiadavky na svetlo. Je potrebné zvoliť takú svietivosť, ktorá vyhovuje použitému testovaciemu organizmu. Pre odporúčané druhy zelených rias sa svietivosť zvolí na úrovni testovacích roztokov z rozsahu 60 – 120 · µE m^{-2} s^{-1} pri meraní vo fotosynteticky účinnom rozsahu vlnovej dĺžky 400 – 700 nm s použitím vhodného receptora. Niektoré druhy, najmä druh *Anabaena flos-aquae*, rastú dobre pri nižšej svietivosti a pri vysokej sa môžu poškodiť. Pre takéto druhy by sa mala zvoliť priemerná svietivosť v rozsahu od 40 do 60 µE m^{-2} s^{-1}. (V prípade prístrojov na meranie svetla kalibrovaných v luxoch zodpovedá príslušný rozsah 4 440 – 8 880 luxov pre studené biele svetlo približne odporúčanej intenzite svetla 60 – 120 µE m^{-2} s^{-1}.) Svietivosť udržujte v rozsahu ± 15 % priemernej svietivosti v priestore inkubácie.

Dĺžka trvania testu

32. Test trvá spravidla 72 hodín. Môže sa však skrátiť alebo predĺžiť za predpokladu, že budú splnené všetky kritériá platnosti uvedené v bode 11.

Merania a analytické stanovenia

33. Počas trvania testu sa v každej banke minimálne jedenkrát za deň stanoví množstvo biomasy rias. Ak sa merania vykonávajú s malými objemami odobratými z testovacieho roztoku pipetou, netreba ich nahradiť.

34. Meranie množstva biomasy sa vykonáva manuálne počítaním buniek pomocou mikroskopu alebo elektronickým počítadlom častíc (ako počet buniek a/alebo biologický objem). Môžu sa použiť alternatívne techniky napr. prietoková cytometria, chlorofylová fluorescencia *in vitro* alebo *in vivo* (5) (6), alebo optická hustota, ak je možné na množstve biomasy vyskytujúcom sa v teste preukázať uspokojivú koreláciu s biomasou.

35. Meranie pH roztokov sa vykonáva na začiatku a na konci testu.

36. Ak je k dispozícii analytický postup na stanovenie testovanej chemikálie v použitom rozsahu koncentrácie, testovacie roztoky by sa mali analyzovať, aby sa overili počiatočné koncentrácie a zachovávanie expozičných koncentrácií počas testu.

37. Analýza koncentrácie testovanej chemikálie na začiatku a na konci testu nízkej a vysokej testovacej koncentrácie a koncentrácie okolo očakávanej hodnoty EC_{50} môže byť dostatočná, ak je pravdepodobné, že expozičné koncentrácie sa budú odlišovať o menej ako 20 % nominálnych hodnôt počas testu. Analýza všetkých testovacích koncentrácií na začiatku a na konci testu sa odporúča vtedy, al nie je pravdepodobné, že sa koncentrácie udržia v rozsahu od 80 do 120 % nominálnej koncentrácie. Pre prchavé, nestabilné alebo silne adsorbujúce testované chemikálie sa odporúča ďalší odber vzoriek na analýzu v 24 hodinových intervaloch počas expozície, aby sa lepšie stanovil úbytok testovanej chemikálie. Pre tieto chemické látky môžu byť potrebné ďalšie replikáty. Vo všetkých prípadoch je potrebné stanoviť koncentrácie testovanej chemikálie iba v jednej replikovanej nádobe na každú testovaciu koncentráciu (alebo na obsahy nádob rozdelené podľa replikátu).

38. S testovacím médiom pripraveným osobitne na analýzu expozičných koncentrácií počas testu by sa malo zaobchádzať rovnako ako s tými, ktoré sa používajú na testovanie, t. j. mali by sa inokulovať riasami a inkubovať za rovnakých podmienok. Ak sa vyžaduje analýza koncentrácie rozpustenej testovanej chemikálie, môže byť potrebné oddeliť riasy od média. Na separáciu by sa mala prednostne použiť centrifugácia pri nízkej hodnote g, dostatočnej na usadenie rias.

39. Ak je dokázané, že koncentrácia chemikálie, ktorá sa testuje, je počas testu v dostatočnej miere udržiavaná v rozsahu ± 20 % nominálnej hodnoty alebo nameranej počiatočnej koncentrácie, analýza výsledkov sa môže zakladať na nominálnych hodnotách alebo nameraných počiatočných hodnotách. Ak je odchýlka od nominálnej alebo nameranej počiatočnej koncentrácie väčšia ako ± 20 %, analýza výsledkov by mala byť založená na geometrickej strednej koncentrácii počas expozície alebo na modeloch opisujúcich pokles koncentrácie testovanej chemikálie (3) (7).

40. Inhibičný test rastu rias je dynamickejším testovacím systémom ako väčšina iných krátkodobých testov toxicity pre vodné prostredie. V dôsledku toho môže byť zložité stanoviť skutočné expozičné koncentrácie, najmä pre

adsorbujúce chemikálie testované pri nízkych koncentráciách. V takýchto prípadoch úbytok testovanej chemikálie z roztoku na základe adsorpcie s narastajúcim množstvom biomasy rias neznamená, že sa látka z testovacieho systému stratila. Pri analýze výsledku testu by sa malo skontrolovať, či zníženie koncentrácie testovanej chemikálie v priebehu testu sprevádza zníženie inhibície rastu. Ak áno, môže sa zvážiť použitie vhodného modelu, ktorý opisuje pokles koncentrácie testovanej látky (7). Ak nie, môže byť vhodné založiť analýzu výsledkov na počiatočných (nominálnych alebo nameraných) koncentráciách.

Ďalšie pozorovania

41. Na konci testu by sa malo vykonať mikroskopické pozorovanie na overenie normálneho a zdravého vzhľadu inokula a na zistenie akéhokoľvek neobvyklého vzhľadu rias (čo môže byť zapríčinené expozíciou testovanej chemikálie).

Limitný test

42. V určitých situáciách, napríklad keď z predbežného testu vyplýva, že testovaná chemikália nemá žiadne toxické účinky pri koncentráciách do 100 mg/l alebo do jej limitu rozpustnosti v testovacom médiu (podľa toho, ktorá hodnota je nižšia), sa môže vykonať limitný test umožňujúci porovnanie reakcií v kontrolnej skupine a jednej skupine s aplikovanou chemikáliou (100 mg/l alebo koncentrácia rovná limitu rozpustnosti). Dôrazne sa odporúča, aby sa táto skutočnosť zakladala na analýze expozičnej koncentrácie. Na limitný test sa vzťahujú všetky už uvedené testovacie podmienky a kritériá platnosti s výnimkou, že počet replikátov s aplikovanou chemikáliou by mal byť minimálne šesť. Závislé premenné reakcie v kontrolnej skupine a skupine s aplikovanou chemikáliou sa môžu analyzovať použitím štatistického testu na porovnanie stredných hodnôt, napríklad Studentovho t-testu. Ak variancie v obidvoch skupinách nie sú rovnaké, je potrebné vykonať t-test upravený na nerovnaké rozptyly.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Vytvorenie rastových kriviek

43. Množstvo biomasy v testovacích nádobách môže byť vyjadrené v jednotkách náhradného parametra použitého na meranie (napr. počet buniek, fluorescencia).

44. Na vytvorenie rastových kriviek je potrebné usporiadať do tabuľky odhadnuté koncentrácie biomasy v testovacích kultúrach a kontrolných kultúrach spolu s koncentráciami testovaného materiálu a časmi merania zaznamenanými s rozlíšením minimálne na celé hodiny. V tomto prvom štádiu môžu byť užitočné obidve stupnice, logaritmická aj lineárna, ale logaritmická stupnica je povinná a spravidla lepšie vyjadruje parametre charakterizujúce rast počas trvania testu. Treba si uvedomiť, že exponenciálny rast je vyjadrený priamkou, ak sa vytvorí na logaritmickej stupnici, a že sklon priamky (strmosť) označuje špecifickú rýchlosť rastu.

45. Grafické znázornenie slúži na kontrolu, či kontrolné kultúry počas testu rastú exponenciálne pri predpokladanej rýchlosti rastu. Je potrebné kriticky preskúmať všetky dátové body a podobu diagramov a skontrolovať prvotné údaje a postupy, aby sa zistili možné chyby. Skontrolovať treba najmä všetky dátové body, ktorých odchýlky sa zdajú byť spôsobené systematickou chybou. Ak je zrejmé, že chyby v postupe je možné zistiť a/alebo sa pokladajú za vysoko pravdepodobné, konkrétny dátový bod sa označí ako extrémna hodnota a nezahrnie sa do následnej štatistickej analýzy. (Nulová koncentrácia rias v jednej z dvoch alebo troch replikovaných nádob môže naznačovať, že nádoba nebola správne inokulovaná alebo nebola riadne vyčistená.) Dôvody na vyradenie dátového bodu ako extrémnej hodnoty je potrebné jasne uviesť v skúšobnom protokole. Prípustným dôvodom sú iba (zriedkavé) chyby v postupe a nie nepresnosť. Štatistické postupy v prípade identifikácie extrémnych hodnôt majú obmedzené použitie pre tento typ problému a nemôžu nahradiť odborné posúdenie. Extrémne hodnoty (takto označené) sa musia prednostne ponechať medzi dátovými bodmi uvedenými v každej ďalšej grafickej alebo tabuľkovej prezentácii údajov.

Premenné hodnoty reakcie

46. Účelom testu je stanoviť účinky testovanej chemikálie na rast rias. Táto testovacia metóda opisuje dve premenné hodnoty reakcie, keďže rôzne jurisdikcie majú rozdielne preferencie a regulačné požiadavky. Na to, aby boli výsledky testu prijateľné vo všetkých jurisdikciách, by sa účinky mali hodnotiť s použitím obidvoch uvedených závisle premenných reakcie a) a b).

a) Priemerná špecifická rýchlosť rastu: táto premenná hodnota reakcie sa vypočíta na základe logaritmického nárastu množstva biomasy počas testu vyjadreného za deň.

b) Výťažok: táto závisle premenná reakcie predstavuje rozdiel množstva biomasy na konci testu a počiatočného množstva biomasy.

47. Je potrebné si uvedomiť, že hodnoty toxicity vypočítané použitím týchto dvoch závisle premenných veličín reakcie nie sú porovnateľné a tento rozdiel sa musí zohľadniť pri použití výsledkov testu. Pri dodržaní testovacích podmienok tejto testovacej metódy budú hodnoty EC_x založené na priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) spravidla vyššie ako výsledky založené na výťažku (E_yC_x), a to v dôsledku matematického základu príslušných postupov. Nemalo by sa to vysvetľovať ako rozdiel v citlivosti medzi obidvoma závisle premennými veličinami reakcie, ale len tak, že sa hodnoty odlišujú matematicky. Koncepcia priemernej špecifickej rýchlosti rastu sa zakladá na všeobecnom exponenciálnom modeli rastu rias v nelimitovaných kultúrach, kde sa toxicita stanovuje na základe účinkov na rýchlosť rastu, bez závislosti od absolútnej úrovne špecifickej rýchlosti rastu kontrolnej kultúry, od sklonu krivky grafu reakcie a koncentrácie alebo od dĺžky testu. Naopak je to v prípade výsledkov založených na závisle premennej veličine výťažku, ktoré sú závislé od všetkých ďalších premenných. Hodnota E_yC_x je závislá od špecifickej rýchlosti rastu druhov rias, ktoré sa používajú v každom teste, a od maximálnej špecifickej rýchlosti rastu, ktorá sa môže meniť medzi druhmi a dokonca aj medzi rozdielnymi kmeňmi rias. Táto závisle premenná veličina by sa nemala používať na porovnávanie citlivosti na toxické látky medzi druhmi rias alebo dokonca odlišnými kmeňmi. Zatiaľ čo z vedeckého hľadiska sa na odhady toxicity uprednostňuje použitie priemernej špecifickej rýchlosti rastu, do tejto testovacej metódy bolo zahrnuté aj stanovenie toxicity na základe výťažku, aby sa tak vyhovelo regulačným požiadavkám platným v niektorých krajinách.

Priemerná rýchlosť rastu

48. Priemerná špecifická rýchlosť rastu pre konkrétny čas sa vypočíta ako logaritmus nárastu množstva biomasy z rovnice pre každú jednotlivú kontrolnú nádobu a nádobu s aplikovanou chemikáliou [1]:

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

kde:

μ_{i-j} je priemerná špecifická rýchlosť rastu od času *i* do *j*,

X_i je množstvo biomasy v čase *i*,

X_j je množstvo biomasy v čase *j*.

Pre každú skupinu s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú skupinu sa vypočíta stredná hodnota rýchlosti rastu spolu s odhadmi rozptylu.

49. Vypočíta sa priemerná špecifická rýchlosť rastu počas celej dĺžky testu (spravidla 0. – 3. deň), a to radšej s použitím nominálne inokulovanej biomasy ako počiatočnej hodnoty, než s použitím nameranej počiatočnej hodnoty, lebo sa tak spravidla dosiahne väčšia presnosť. Ak zariadenie použité na meranie biomasy umožňuje dostatočne presné stanovenie malého množstva inokula biomasy (napr. prietokový cytometer), potom sa môže použiť nameraná počiatočná koncentrácia biomasy. Stanoví sa tiež rýchlosť rastu po častiach výpočtom špecifických rýchlostí rastu pre každý deň počas testu (0. – 1. deň, 1. – 2. deň a 2. – 3. deň) a treba overiť, či je kontrolná rýchlosť rastu naďalej konštantná (pozri kritériá platnosti v bode 11). Výrazne nižšia špecifická rýchlosť rastu v deň 1 ako celková priemerná špecifická rýchlosť rastu môže indikovať lag fázu. Zatiaľ čo v kontrolných kultúrach je možné lag fázu minimalizovať a prakticky eliminovať vhodným namnožením prípravnej kultúry, lag fáza v exponovaných kultúrach môže indikovať regeneráciu po pôvodnom toxickom strese alebo zníženú expozíciu v dôsledku úbytku testovanej chemikálie (vrátane sorpcie na biomasu rias) po počiatočnej expozícii. Môže sa teda stanoviť rýchlosť rastu po častiach na vyhodnotenie účinkov testovanej látky, ktoré sa vyskytnú počas expozície. Zo značných rozdielov medzi fázovou rýchlosťou rastu a priemernou rýchlosťou rastu vyplýva odchýlka od konštantného exponenciálneho rastu, ako aj skutočnosť, že bolo zaručené dôkladné preskúmanie rastových kriviek.

50. Inhibícia rýchlosti rastu v percentách pre každý replikát s aplikovanou chemikáliou sa vypočíta pomocou rovnice [2]:

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

kde:

$\% I_r$ = percentuálna hodnota inhibície priemernej špecifickej rýchlosti rastu,

μ_C = stredná hodnota priemernej špecifickej rýchlosti rastu (μ) v kontrolnej skupine,

μ_T = priemerná špecifická rýchlosť rastu pre replikát s aplikovanou chemikáliou.

51. Ak sa na prípravu testovacích roztokov použijú rozpúšťadlá, vo výpočte percentuálnej inhibície by sa mali použiť skôr kontrolné roztoky s rozpúšťadlom než kontrolné roztoky bez rozpúšťadiel.

Výťažok

52. Výťažok sa vypočíta ako rozdiel množstva biomasy na konci testu a počiatočného množstva biomasy pre každú jednotlivú kontrolnú nádobu a nádobu s aplikovanou chemikáliou. Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vypočíta stredná hodnota výťažku spolu s odhadmi rozptylu. Percentuálna inhibícia výťažku ($\% I_y$) sa môže vypočítať pre každý replikát s aplikovanou chemikáliou takto:

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

kde:

$\% I_y$ = percentuálna inhibícia výťažku,

Y_C = stredná hodnota výťažku v kontrolnej skupine,

Y_T = hodnota výťažku pre replikát s aplikovanou chemikáliou.

Vytvorenie krivky reakcie na koncentráciu

53. Vytvorí sa diagram závislosti percenta inhibície od logaritmu koncentrácie testovanej chemikálie. Diagram je potrebné pozorne skontrolovať a nebrať do úvahy žiadny dátový bod, ktorý bol vylúčený v prvej fáze ako extrémna hodnota. Dátové body sa spoja súvislou čiarou, buď voľne, alebo pomocou počítačovej interpolácie, čím sa získajú prvé poznatky o vzťahu medzi koncentráciou a reakciou, a ďalej sa postupuje presnejšou metódou, prednostne počítačovou štatistickou metódou. V závislosti od plánovaného využitia údajov, kvality (presnosti) a množstva údajov, ako aj dostupnosti nástrojov na analýzu údajov je možné rozhodnúť (niekedy celkom správne) o zastavení analýzy údajov v tomto štádiu a potom jednoducho odčítať kľúčové hodnoty EC_{50} a EC_{10} (a/alebo EC_{20}) z voľne zostrojenej krivky (pozri tiež ďalšiu časť o stimulačných účinkoch). Platné dôvody na nepoužitie štatistickej metódy môžu byť takéto:

— údaje nie sú vhodné pre počítačové metódy, ktoré by poskytli spoľahlivejšie výsledky, aké je možné získať odborným posúdením – za takýchto okolností niektoré počítačové programy môžu dokonca poskytnúť nesprávne riešenie (iterácie nemusia konvergovať atď.).

— Reakcie stimulovaného rastu nie je možné náležite spracovať s použitím dostupných počítačových programov (pozri ďalej).

Štatistické postupy

54. Cieľom je získať kvantitatívny vzťah medzi koncentráciou a reakciou pomocou regresnej analýzy. Je možné použiť váženú lineárnu regresiu po vykonaní linearizovanej transformácie reakčných údajov – napríklad na probitové alebo logitové, prípadne Weibullove jednotky (8), ale uprednostňujú sa techniky nelineárnej regresie, ktorými sa lepšie spracujú nevyhnutné nepresnosti údajov a odchýlky od hladkých rozdelení. Priblížením buď k nulovej, alebo k úplnej inhibícii sa takéto nepresnosti môžu transformáciou zväčšiť a ovplyvniť analýzu (8). Je potrebné si uvedomiť, že štandardné metódy analýzy s použitím probitovej, logitovej alebo Weibullovej transformácie sú určené na použitie na kvantálne údaje (napr. o mortalite alebo prežití) a musia sa modifikovať, aby sa prispôsobili údajom o raste alebo biomase. Osobitné postupy na stanovenie hodnôt ECx z kontinuálnych údajov je možné nájsť v literatúre pod číslami (9) (10) a (11). Ďalšie podrobnosti o použití nelineárnej regresnej analýzy sú uvedené v dodatku 5.

55. Pre každú závisle premennú veličinu reakcie, ktorá sa má analyzovať, sa na výpočet bodových odhadov hodnôt ECx použije vzťah medzi koncentráciou a reakciou. Ak je to možné, je potrebné stanoviť 95 % hranice spoľahlivosti pre každý odhad. Vhodnosť reakčných údajov pre regresný model je potrebné vyhodnotiť buď graficky, alebo štatisticky. Regresná analýza sa musí vykonať s použitím reakcií jednotlivých replikátov, nie stredných hodnôt skupiny s aplikovanou chemikáliou. Ak je však zostrojenie nelineárnej krivky zložité alebo nemožné pre príliš veľký rozptyl údajov, problému je možné sa vyhnúť vykonaním regresie na skupinovom základe ako praktický spôsob zníženia vplyvu podozrivých extrémnych hodnôt. Použitie tejto možnosti by sa malo uviesť v protokole o skúške ako odchýlka od obvyklého postupu, keďže krivky zostrojené s jednotlivými replikátmi nepriniesli dobrý výsledok.

56. Odhady hodnôt EC_{50} a hranice spoľahlivosti sa môžu získať aj použitím lineárnej interpolácie metódou ‚bootstrap' (13), ak sú dostupné regresné modely/metódy nevhodné pre dané údaje.

57. Pre odhad koncentrácií LOEC aj NOEC v prípade účinkov testovanej chemikálie na rýchlosť rastu je potrebné porovnať stredné hodnoty skupiny s aplikovanou chemikáliou pomocou techník na analýzu rozptylu (ANOVA). Stredná hodnota pre každú koncentráciu sa musí potom porovnať s kontrolnou strednou hodnotou s použitím príslušného viacnásobného porovnania alebo testovacej metódy trendu. Môže sa použiť Dunnettov alebo Williamsov test (12) (14) (15) (16) (17). Je potrebné posúdiť, či je dodržaný predpoklad homogenity rozptylu ANOVA. Toto posúdenie sa môže vykonať graficky alebo formálnym testom (17). Vhodný je Levenov alebo Bartlettov test. Nesplnenie predpokladu homogenity rozptylov je niekedy možné korigovať logaritmickou transformáciou údajov. Ak je heterogenita rozptylu extrémna a nie je možné ju korigovať transformáciou, je potrebné posúdiť analýzu metódami, ako sú napríklad ‚step-down Jonkheere' testy trendu. Ďalšie informácie o stanovení hodnoty NOEC je možné nájsť v literatúre pod číslom (11).

58. Najnovší vývoj vo vede vedie k odporúčaniu upustiť od koncepcie NOEC a nahradiť ju regresiou založenou na bodovom odhade ECx. Príslušná hodnota x pre tento test na riasach nebola stanovená. Vhodný sa zdá byť rozsah 10 – 20 % (v závislosti od zvolenej závisle premennej veličiny reakcie), pričom prednostne by sa mali uvádzať hodnoty EC_{10} a EC_{20}.

Stimulácia rastu

59. Niekedy sa pri nízkych koncentráciách pozoruje stimulácia rastu (negatívna inhibícia). Môže to byť dôsledok hormézy (‚toxickej stimulácie') alebo pridania stimulujúcich rastových faktorov s testovaným materiálom do použitého minimálneho média. Treba si uvedomiť, že pridanie anorganických živín by nemalo mať žiadny priamy účinok, kedže testovacie médium by si počas celého testu malo zachovávať nadbytok živín. Stimuláciu pri nízkych dávkach je možné pri výpočtoch EC_{50} zvyčajne ignorovať, pokiaľ nie je extrémna. Ak je však stimulácia extrémna alebo sa má vypočítať hodnota ECx pre nízke x, môžu byť potrebné osobitné postupy. Ak je to možné, malo by sa zabrániť vypusteniu stimulačných reakcií z analýzy údajov, a ak dostupný softvér na vytvorenie krivky nemôže prijať malú stimuláciu, môže sa použiť lineárna interpolácia metódou ‚bootstrap'. Ak je stimulácia extrémna, môže sa zvážiť model hormézy (18).

Netoxická inhibícia rastu

60. Testovacie materiály absorbujúce svetlo môžu spôsobiť zníženie rýchlosti rastu, keďže tienenie znižuje množstvo dostupného svetla. Takéto fyzikálne typy účinkov je potrebné oddeliť od toxických účinkov modifikáciou podmienok testu, a to je potrebné osobitne uviesť v skúšobnom protokole. Usmernenie je možné nájsť v literatúre pod číslami (2) a (3).

PROTOKOL O SKÚŠKE

61. Skúšobný protokol musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti vrátane limitu rozpustnosti vo vode,

— identifikačné údaje chemikálie (napr. číslo CAS) vrátane čistoty (nečistôt).

Testovacie druhy:

— kmeň, dodávateľ alebo zdroj a použité podmienky kultivácie.

Podmienky testu:

— dátum začiatku testu a jeho dĺžka,

— opis koncepcie testu: testovacie nádoby, objemy kultúr, hustota biomasy na začiatku testu,

— zloženie média,

— testovacie koncentrácie a replikáty (napr. počet replikátov, počet testovacích koncentrácií a použitý geometrický rad),

— opis prípravy testovacích roztokov vrátane použitia rozpúšťadiel atď.,

— zariadenie na kultiváciu,

— intenzita svetla a kvalita (zdroj, homogenita),

— teplota,

— testované koncentrácie: nominálne testované koncentrácie a všetky výsledky analýz na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách. V správe sa musí uviesť výťažnosť a kvantifikačný limit v testovacom matrixe,

— všetky odchýlky od tejto testovacej metódy,

— metóda na stanovenie množstva biomasy a dôkaz korelácie medzi meraným parametrom a sušinou.

Výsledky:

— hodnoty pH na začiatku a na konci testu pri všetkých aplikáciách chemickej látky,

— množstvo biomasy v každej banke v každom meranom bode a metóda merania množstva biomasy,

— rastové krivky (diagram závislosti množstva biomasy od času),

— vypočítané hodnoty závisle premenných veličín reakcie pre každý replikát s aplikovanou chemikáliou, so strednými hodnotami a s variačným koeficientom pre replikáty,

— grafické znázornenie vzťahu koncentrácie a účinku,

— odhady toxicity pre závisle premenné veličiny reakcie napr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a príslušné intervaly spoľahlivosti. hodnoty LOEC a NOEC a štatistické metódy použité na ich stanovenie v prípade, že sa vypočítavajú,

— ak sa používa technika ANOVA, veľkosť účinku, ktorý je možné detegovať (napr. najmenej významný rozdiel),

— každá stimulácia rastu zistená v ľubovoľnej vzorke s aplikovanou chemikáliou,

— všetky iné pozorované účinky, napríklad morfologické zmeny rias,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dodatok 1

Vymedzenia pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto pojmy a skratky:

Biomasa je suchá hmotnosť živej hmoty nachádzajúcej sa v populácii, vyjadrenej ako daný objem, napríklad mg rias/liter testovacieho roztoku, napr. mg rias/liter testovacieho roztoku. ‚Biomasa' je zvyčajne vymedzená ako hmotnosť, ale v tomto teste sa uvedené slovo používa na vyjadrenie hmotnosti na objem. V tomto teste sa bežne merajú aj náhradné parametre biomasy ako napríklad počet buniek, fluorescencia atď., a teda používanie pojmu ‚biomasa' sa vzťahuje aj na tieto náhradné parametre.

Chemikália je látka alebo zmes.

Variačný koeficient (VK) je bezrozmerná hodnota premenlivosti parametra vymedzená ako pomer štandardnej odchýlky k strednej hodnote. Môže byť vyjadrená aj ako percentuálna hodnota. Stredný variačný koeficient priemernej špecifickej rýchlosti rastu sa v repilátoch kontrolných kultúr počíta takto:

1. pre príslušné replikáty sa vypočíta percentuálna hodnota VK priemernej špecifickej rýchlosti rastu na základe denných/fázových rýchlostí rastu,

2. vypočíta sa stredná hodnotu zo všetkých hodnôt vypočítaných v bode 1, čím sa získa stredný variačný koeficient špecifickej dennej/fázovej rýchlosti rastu v replikátoch kontrolných kultúr.

EC_x je koncentrácia testovanej chemikálie rozpustenej v testovacom médiu, ktorej dôsledkom je x % (napr. 50 %) zníženie rastu testovacieho organizmu v rámci stanoveného času expozície (je potrebné výslovne uviesť, ak sa odchyľuje od celkovej alebo bežnej dĺžky testu). Na jednoznačné označenie hodnoty EC odvodenej z rýchlosti rastu alebo výťažku sa používa symbol ‚E_rC' pre rýchlosť rastu a symbol ‚E_yC' pre výťažok.

Rastové médium je kompletné syntetické kultivačné médium, v ktorom rastie testovaná riasa vystavená pôsobeniu testovanej chemikálie. Testovaná chemikália sa spravidla rozpustí v testovacom médiu.

Rýchlosť rastu (priemerná špecifická rýchlosť rastu) je logaritmickým nárastom množstva biomasy počas expozície.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovacia koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje, že chemikália má štatisticky významný účinok na zníženie rastu (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou kultúrou v rámci daného času expozície. Škodlivý účinok všetkých testovacích koncentrácií nad LOEC však musí byť vždy rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila koncentrácia LOEC (a teda aj koncentrácia NOEC).

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovacia koncentrácia bezprostredne pod koncentráciou LOEC.

Závislé premenná veličina reakcie je premenná na odhad toxicity odvodená z akýchkoľvek meraných parametrov opisujúcich biomasu rôznymi metódami výpočtu. V prípade tejto testovacej metódy sú rýchlosti rastu a výťažok závisle premennými veličinami reakcie odvodenými priamo z merania množstva biomasy alebo uvedených náhradných parametrov.

Špecifická rýchlosť rastu je premenná hodnota reakcie vymedzená ako kvocient rozdielu prirodzených logaritmov parametra pozorovania (v rámci tejto testovacej metódy biomasy) a príslušného časového intervalu.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Výťažok je rozdiel hodnoty meranej premennej na konci expozície a hodnoty meranej premennej na jej začiatku, ktorý vyjadruje nárast množstva biomasy počas testu.

Dodatok 2

Kmene, ktoré sa ukázali ako vhodné na účely testu

Zelené riasy

Pseudokirchneriella subcapitata (predtým známa ako *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, SAG 61.81

Desmodesmus subspicatus (predtým známa ako *Scenedesmus subspicatus*), SAG 86.81

Rozsievky

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Sinice

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

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Zdroje kmeňov

Odporúčané kmene sú dostupné z kultúr s jedným druhom rias z týchto zbierok (v abecednom poradí)

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

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

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

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

Vzhľad a charakteristika odporúčaných druhov

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Vzhľad	zakrivené, skrútené samostatné bunky	oválne, väčšinou samostatné bunky	tyčinky	reťazce oválnych buniek	tyčinky
Veľkosť (dĺžka × šírka) µm	8 – 14 × 2 – 3	7 – 15 × 3 – 12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Objem buniek (v μm^3 na bunku)	40 – 60 (1)	60 – 80 (1)	40 – 50 (1)	30 – 40 (1)	2,5 (2)
Sušina buniek (v mg na bunku)	$2 – 3 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$1 – 2 \times 10^{-8}$	$2 – 3 \times 10^{-9}$
Rýchlosť rastu (3) ($deň^{-1}$)	1,5 – 1,7	1,2 – 1,5	1,4	1,1 – 1,4	2,0 – 2,4

(1) Merané elektronickým počítadlom častíc.
(2) Vypočítané z veľkosti.
(3) Najčastejšie pozorovaná rýchlosť rastu v OECD médiu s intenzitou svetla približne 70 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ a 21 °C.

Osobitné odporúčania pre kultiváciu a zaobchádzanie s odporúčanými testovacími druhmi

Pseudokirchneriella subcapitata a Desmodesmus subspicatus

Tieto zelené riasy sa spravidla ľahko uchovávajú v rôznych kultivačných médiách. Informácie týkajúce sa vhodných médií sú dostupné zo zbierok kultúr. Bunky sú spravidla samostatné, bunková hustota sa stanovuje jednoducho s použitím elektronického počítadla častíc alebo mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Na uchovávanie zásobnej kultúry sa môžu použiť rôzne rastové médiá. Je mimoriadne dôležité, aby sa pri obnovovaní zabránilo jednorazovej kultúre prekročiť log fázu rastu, v tomto bode je obnova zložitá.

Anabaena flos-aquae vytvára zhluky spletených reťazcov buniek. Veľkosť týchto zhlukov sa môže meniť podľa podmienok kultivácie. Môže byť potrebné rozdeliť tieto zhluky, ak sa na stanovenie množstva biomasy použije počítanie pomocou mikroskopu alebo elektronického počítadla častíc.

Môže sa použiť sonifikácia čiastkových vzoriek na rozbitie reťazcov, aby sa znížila variabilita počtu buniek. Dlhšia sonifikácia, ako sa vyžaduje na rozbitie reťazcov na kratšie úseky, môže poškodiť bunky. Intenzita sonifikácie a jej trvanie musia byť rovnaké pri každom spracovaní.

Je potrebné spočítať dostatočné množstvo políčok na hemocytometri (minimálne 400 buniek) na elimináciu variability. Tým sa zlepší spoľahlivosť mikroskopického stanovenia hustoty.

Elektronické počítadlo častíc sa môže použiť na stanovenie celkového objemu buniek rodu Anabaena po rozbití reťazcov buniek opatrnou sonifikáciou. Je potrebné prispôsobiť silu sonifikácie, aby sa zabránilo rozbitiu buniek.

Použite vortexový mixér alebo podobnú vhodnú metódu na zabezpečenie toho, aby suspenzia rias, ktorá sa použije na inokuláciu testovacích nádob, bola dobre premiešaná a homogénna.

Testovacie nádoby by sa mali umiestniť na orbitálnu trepačku s platformou približne pri 150 otáčkach za minútu. Alternatívne sa môže použiť občasné miešanie na zníženie tvorby zhlukov rodu *Anabaena*. Ak sa vyskytne zhlukovanie, je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa dosiahli reprezentatívne vzorky na stanovenie množstva biomasy. Môže byť potrebné prudké premiešanie pred odberom vzoriek, aby sa rozbili zhluky rias.

Synechococcus leopoliensis

Na uchovávanie zásobnej kultúry sa môžu použiť rôzne rastové médiá. Informácie týkajúce sa vhodných médií sú dostupné zo zbierok kultúr.

Synechococcus leopoliensis rastie vo forme samostatných tyčinkovitých buniek. Bunky sú veľmi malé, čo sťažuje použitie počítania pomocou mikroskopu pri meraniach množstva biomasy. Užitočné sú elektronické počítadlá častíc vybavené na počítanie menších častíc až veľkosti približne 1 µm. Vhodné sú tiež fluorometrické merania *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Na uchovávanie zásobnej kultúry sa môžu použiť rôzne rastové médiá. Informácie týkajúce sa vhodných médií sú dostupné zo zbierok kultúr. Treba si uvedomiť, že do média je potrebné pridať kremičitan.

Navicula pelliculosa môže v určitých rastových podmienkach vytvárať zhluky. Z dôvodu tvorby lipidov majú bunky rias niekedy tendenciu akumulovať sa vo forme povrchového filmu. Za týchto okolností je potrebné prijať osobitné opatrenia pri odoberaní čiastkových vzoriek na stanovenie množstva biomasy, aby bolo možné získať reprezentatívne vzorky. Môže byť potrebné prudké premiešanie napr. použitím vortexového mixéra.

Dodatok 3

Rastové médiá

Môže sa použiť jedno z týchto rastových médií:

— médium OECD: pôvodné médium OECD TG 201, tiež podľa ISO 8692,

— US. EPA médium AAP, tiež podľa ASTM.

Pri príprave týchto médií sa musia použiť reagenty alebo chemikálie analytickej kvality a deionizovaná voda.

Zloženie média AAP (U.S. EPA) a média OECD TG 201.

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

Molárny pomer EDTA a železa je mierne vyšší ako jeden. Zabraňuje to vyzrážaniu železa a zároveň sa minimalizuje chelácia ťažkých kovov.

V teste s rozsievkou *Navicula pelliculosa* sa musí k obidvom médiám pridať $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$, aby sa dosiahla koncentrácia 1,4 mg Si/l.

Príslušná hodnota pH média sa dosiahne rovnováhou medzi uhličitanovým systémom média a parciálnym tlakom CO_2 v okolitom vzduchu. Približný vzťah medzi pH pri 25 °C a molárnou koncentráciou hydrogenuhličitanu je:

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

pri 15 mg $NaHCO_3$/l, pHeq = 7,5 (U.S. EPA médium) alebo pri 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (médium OECD).

Zloženie prvkov v testovacom médiu

Prvok	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

Príprava média OECD

Živina	Koncentrácia v zásobnom roztoku
Zásobný roztok 1: makroživiny	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Zásobný roztok 2: železo	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l

Živina	Koncentrácia v zásobnom roztoku
Zásobný roztok 3:	
stopové prvky	
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
Zásobný roztok 4:	
hydrogénuhličitan	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Zásobné roztoky sa sterilizujú membránovou filtráciou (stredný priemer pórov 0,2 µm) alebo autoklávovaním (120 ° C, 15 min). Roztoky sa skladujú v tme pri teplote 4 °C.

Zásobné roztoky 2 a 4 sa neautoklávujú, ale sterilizujú membránovou filtráciou.

Rastové médium sa pripraví pridaním príslušného objemu zásobných roztokov 1 až 4 do vody:

do 500 ml sterilizovanej vody sa pridá:

10 ml zásobného roztoku 1,

1 ml zásobného roztoku 2,

1 ml zásobného roztoku 3,

1 ml zásobného roztoku 4.

Doplní sa sterilizovanou vodou do 1 000 ml.

Je potrebné poskytnúť dostatočný čas na vyrovnanie média s atmosférickým CO_2, v prípade potreby niekoľkohodinovým prebublávaním sterilným filtrovaným vzduchom.

Príprava U.S. EPA média AAP

1. Do približne 900 ml deionizovanej alebo destilovanej vody sa pridá 1 ml každého zásobného roztoku v *2.1 – 2.7* a potom sa zriedi na 1 liter.

2. Zásobné roztoky makroživín sa pripravujú rozpustením týchto látok v 500 ml deionizovanej alebo destilovanej vody. Reagenty *2.1, 2.2, 2.3* a *2.4* sa môžu spojiť do jedného zásobného roztoku.

2,1 $NaNO_3$ 12,750 g.

2,2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 6,082 g.

2,3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g.
2,4	Zásobný roztok mikroživín (pozri 3)	
2,5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g.
2,6	K_2HPO_4	0,522 g.
2,7	$NaHCO_3$	7,500 g.
2,8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Pozri poznámku 1.

Poznámka 1: Používa sa iba pre testovacie druhy rozsievok. Môže sa pridať priamo (202,4 mg) alebo prostredníctvom zásobného roztoku, aby sa dosiahla konečná koncentrácia Si v médiu 20 mg/l.

3. Zásobný roztok mikroživín sa pripravuje rozpustením týchto látok v 500 ml deionizovanej alebo destilovanej vody:

3,1	H_3BO_3	92,760 mg.
3,2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg.
3,3	$ZnCl_2$	1,635 mg.
3,4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg.
3,5	CoCl2 · 6H2O	0,714 mg.
3,6	$Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg.
3,7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg.
3,8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg. [dinátrium (etyléndinitrilo) tetraacetát].
3,9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg pozri poznámku 2.

Poznámka 2: Používa sa iba v médiu pre zásobné roztoky kultúry druhov rozsievok.

4. Hodnota pH sa upraví na 7,5 ± 0,1 pridaním 0,1 *N* alebo 1,0 *N* NaOH alebo HCl.

5. Médium sa prefiltruje do sterilnej nádoby cez 0,22 µm membránový filter, ak sa má používať počítač častíc, alebo cez 0,45 µm filter v prípade, že sa počítač častíc nepoužíva.

6. Médium sa až do použitia skladuje v tme pri teplote približne 4 °C.

Dodatok 4

Vzor postupu kultivácie rias

Všeobecné pozorovania

Účelom kultivácie podľa tohto postupu je získať kultúry rias na testovanie toxicity.

Musia sa použiť vhodné metódy na zabezpečenie toho, aby kultúry rias neboli infikované baktériami. Axenické kultúry môžu byť vhodné, ale potrebné je vytvoriť a používať kultúry s jedným druhom rias.

Všetky činnosti by sa mali vykonávať v sterilných podmienkach, aby sa zamedzilo kontaminácii baktériami a inými riasami.

Zariadenia a materiály

Pozri v časti Testovacia metóda: Zariadenia.

Postupy na získanie kultúr rias

Príprava živných roztokov (médií):

Všetky živné soli média sa pripravia ako koncentrované zásobné roztoky a skladujú sa v tme a chlade. Tieto roztoky sa sterilizujú filtráciou alebo autoklávovaním.

Médium sa pripraví pridaním správneho množstva zásobného roztoku do sterilnej destilovanej vody, pričom sa dbá na to, aby nedošlo k infekcii. V prípade tuhého média sa pridáva 0,8 % agaru.

Zásobná kultúra:

Zásobné kultúry sú malé kultúry rias, ktoré sa pravidelne prenášajú do čerstvého média, aby sa použili ako počiatočný testovací materiál. Ak sa kultúry nepoužívajú pravidelne, naočkujú sa do skúmaviek na šikmý agar. Potom sa aspoň raz za dva mesiace prenesú do čerstvého média.

Zásobné kultúry sa kultivujú v kónických bankách obsahujúcich vhodné médium (objem okolo 100 ml). Ak sa riasy inkubujú pri teplote 20 °C pri sústavnom osvetlení, je potrebný prenos raz týždenne.

Prenesie sa také množstvo ‚starej' kultúry sterilnou pipetou do banky s čerstvým médiom, aby počiatočná koncentrácia rýchlo rastúceho druhu bola asi 100-násobne menšia ako v starej kultúre.

Rýchlosť rastu druhu sa môže stanoviť z rastovej krivky. Ak je táto rýchlosť známa, je možné určiť hustotu, pri ktorej by sa mala kultúra preniesť do nového média. To sa musí vykonať skôr, ako kultúra dosiahne stacionárnu fázu rastu.

Prípravná kultúra:

Prípravná kultúra je určená na to, aby poskytla potrebné množstvo rias na inokuláciu testovacích kultúr. Prípravná kultúra sa inkubuje pri testovacích podmienkach a použije sa, pokiaľ je ešte v exponenciálnom raste, spravidla po inkubačnom čase 2 až 4 dni. Kultúry rias obsahujúce deformované alebo abnormálne bunky sa musia odstrániť.

Dodatok 5

Analýza údajov nelineárnou regresiou

Všeobecné aspekty

Reakcia v testoch na riasach a iných testoch mikrobiálneho rastu – rastu biomasy – je svojím charakterom kontinuálna alebo metrická premenná; ide o rýchlosť procesu, ak sa použije rýchlosť rastu, a jeho časový integrál, ak sa zvolí biomasa. Obidva sa vzťahujú na zodpovedajúcu strednú hodnotu reakcie paralelných neexponovaných kontrolných kultúr, ktoré vykazujú maximálnu reakciu za podmienok, ktorým sú vystavené, pričom svetlo a teplota sú v teste na riasach primárnymi určujúcim faktormi. Systém je distribuovaný alebo homogénny a na biomasu sa môže nahliadať ako na kontinuum, pričom sa nezohľadňujú jednotlivé bunky. Distribúcia rozptylu v prípade reakcie takéhoto systému sa vzťahuje iba na experimentálne faktory (spravidla opísané ako logaritmicko-normálne alebo normálne distribúcie chyby). To je opakom typických reakcií pri biologických testoch s kvantálnymi údajmi, pre ktoré sa tolerancia (typicky binomicky rozdelená) jednotlivých organizmov často pokladá za dominantnú zložku rozptylu. Reakcie kontrolných kultúr tu majú hodnotu nula alebo hodnotu pozadia.

V podmienkach bez výskytu komplikácií normalizovaná alebo relatívna reakcia r monotónne klesá z hodnoty 1 (nulová inhibícia) k hodnote 0 (100 % inhibícia). Treba si uvedomiť, že so všetkými reakciami sa spája chyba a že zjavné negatívne inhibície je možné vypočítať iba ako výsledok náhodnej chyby.

Regresná analýza

Modely

Regresná analýza sa zameriava na kvantitatívny opis krivky reakcie na koncentráciu vo forme matematickej regresnej funkcie Y = f (C) alebo častejšie F (Z), kde Z = log C. Inverzné použitie $C = f^{-1}(Y)$ umožňuje výpočet hodnôt EC_x vrátane EC_{50}, EC_{10} a EC_{20} a ich 95 % hraníc spoľahlivosti. Niektoré jednoduché formy matematických funkcií sú schopné úspešne opísať vzťahy medzi koncentráciou a reakciou získané na základe testov inhibície rastu rias. Funkcie zahŕňajú napríklad logaritmickú rovnicu, nesymetrickú Weibullovu rovnicu a logaritmicko-normálnu funkciu distribúcie, z ktorých všetky tvoria sigmoidné krivky asymptoticky sa približujúce k nule pre $C \rightarrow 0$ a jednej pre $C \rightarrow$ nekonečno.

Použitie kontinuálnych modelov prahových funkcií (napr. Kooijmanov model ‚pre inhibíciu populačného rastu', Kooijman a kol., 1996) je najnovším návrhom alebo alternatívou asymptotických modelov. Pri tomto modeli sa nepredpokladajú účinky pri koncentráciách pod určitou prahovou hodnotou, EC_0+, ktorá sa odhadne extrapoláciou vzťahu reakcie na koncentráciu, aby preťala os koncentrácie s použitím jednoduchej kontinuálnej funkcie, ktorá v počiatočnom bode nie je diferencovateľná.

Treba si uvedomiť, že analýza môže byť jednoduchou minimalizáciou súčtov reziduálnych štvorcov (za predpokladu konštantného rozptylu) alebo vážených štvorcov, ak je heterogenita rozptylu kompenzovaná.

Postup

Postup je možné opísať takto: zvolí sa príslušná rovnica funkcie Y = f (C) a aproximuje sa na údaje nelineárnou regresiou. Je potrebné uprednostniť využitie meraní z každej jednotlivej banky pred využitím stredných hodnôt replikátov, aby sa z údajov získalo čo najviac informácií. Na druhej strane, z praktických skúseností vyplýva, že ak je rozptyl vysoký, stredné hodnoty replikátov môžu poskytnúť lepší matematický odhad, menej ovplyvnený systematickými chybami v údajoch, ako v prípade každého jednotlivého experimentálneho bodu.

Do diagramu sa zaznamená aproximovaná krivka a namerané údaje, pričom je potrebné skontrolovať, či je preloženie krivky správne. Obzvlášť užitočným nástrojom na tento účel môže byť analýza rezíduí. Ak zvolený funkčný vzťah použitý na reakciu na koncentráciu neopisuje dobre celú krivku alebo niektorú jej dôležitú časť, ako napríklad reakcie pri nízkych koncentráciách, je potrebné zvoliť inú možnosť aproximácie krivky – napríklad nesymetrickú krivku ako Weibullovu funkciu namiesto symetrickej krivky. Negatívne inhibície môžu byť problémom napríklad pre logaritmicko-normálnu funkciu distribúcie, ktorá si takisto vyžaduje alternatívnu regresnú funkciu.

Neodporúča sa priradiť nulu ani malú kladnú hodnotu k takýmto záporným hodnotám, lebo to skresľuje distribúciu chýb. Môže byť vhodné vyhotoviť samostatné aproximácie krivky na častiach krivky, ako napríklad časť nízkej inhibície na odhad hodnôt $EC_{low\ x}$. Z použitej rovnice sa vypočítajú [‚inverzným odhadom', $C = f^{-1}(Y)$] charakteristické bodové odhady EC_x a zaznamenajú sa ako minimálne EC_{50} a jeden alebo dva odhady $EC_{low\ x}$. Zo skúseností z praktického testovania vyplýva, že presnosť testu na riasach spravidla umožňuje primerane presný odhad pri 10 % úrovni inhibície, ak je dostatok dátových bodov – pokiaľ sa nevyskytne stimulácia pri nízkych koncentráciách ako faktor spôsobujúci zmätok. Presnosť odhadu EC_{20} je často podstatne vyššia ako EC_{10}, keďže hodnota EC_{20} obvykle leží približne na lineárnej časti centrálnej krivky závislosti veličiny od koncentrácie. Niekedy môže byť ťažké interpretovať EC_{10} v dôsledku stimulácie rastu. Preto sa odporúča, aj keď je možné EC_{10} spravidla získať s dostatočnou presnosťou, zaznamenať vždy aj hodnotu EC_{20}.

Váhové faktory

Experimentálny rozptyl nie je spravidla konštantný a obvykle zahŕňa proporcionálnu zložku, preto je výhodné bežne vykonávať váženú regresiu. Váhové faktory pre takúto analýzu sa zvyčajne pokladajú za inverzne proporcionálne rozptylu:

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

Mnohé regresné programy povoľujú možnosť analýzy váženou regresiou s váženými faktormi uvedenými v tabuľke. Obvykle by sa mali vážené faktory normalizovať tak, že sa vynásobia hodnotou $n/\Sigma\ w_i$ (n je počet dátových bodov), aby sa ich súčet rovnal jednej.

Normalizované reakcie

Normalizovanie strednou hodnotou reakcie kontrolnej kultúry skrýva niektoré zásadné problémy a spôsobuje pomerne komplikovanú štruktúru rozptylu. Vydelením reakcií strednou hodnotou reakcie kontrolnej kultúry, aby sa získala percentuálna hodnota inhibície, dochádza k ďalšej chybe zapríčinenej chybou strednej hodnoty. Okrem prípadu, keď je táto chyba zanedbateľne malá, sa musia opraviť váhové faktory v regresii, ako aj hranice spoľahlivosti na kovarianciu s hodnotami pre kontrolnú kultúru (Draper a Smith, 1981). Treba si uvedomiť, že vysoká presnosť odhadovanej strednej hodnoty reakcie kontrolnej kultúry je dôležitá, aby sa minimalizovala celkový rozptyl pre relatívnu reakciu. Uvedený rozptyl je takýto:

(Index i sa vzťahuje na úroveň koncentrácie i a index 0 na kontrolné kultúry)

$$Yi = \text{relatívna reakcia} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

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

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

s normálne rozdelenými údajmi a replikátmi m_i a m_0: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

celkový rozptyl relatívnej reakcie Yi je teda

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

Chyba strednej hodnoty kontrolnej kultúry je inverzne proporcionálna k druhej odmocnine počtu spriemerovaných paralelných kontrolných kultúr, pričom niekedy môže byť opodstatnené zahrnúť predchádzajúce údaje, a tým vo veľkej miere znížiť chybu. Alternatívny postup je nenormalizovať údaje a aproximovať absolútne reakcie vrátane údajov o reakcii kontrolnej kultúry, ale zaviesť hodnoty reakcie kontrolnej kultúry ako ďalší parameter na použitie nelineárnou regresiou. Regresný výpočet má obvykle dva parametre, no táto metóda si vyžaduje tri parametre, a preto je potrebných viac dátových bodov ako pri nelineárnej regresii, pokiaľ ide o údaje, ktoré sú normalizované pri použití vopred nastavenej reakcie kontrolnej kultúry.

Intervaly inverznej spoľahlivosti

Výpočet intervalov spoľahlivosti nelineárnej regresie inverzným odhadom je pomerne zložitý a nie je dostupnou štandardnou voľbou v bežných počítačových štatistických programových balíkoch. Približné hranice spoľahlivosti sa môžu získať pomocou štandardných programov nelineárnej regresie s reparametrizáciou (Bruce a Versteeg, 1992), ktorá zahŕňa prepísanie matematickej rovnice požadovanými bodovými odhadmi, napríklad s EC_{10} a EC_{50} ako parametrami, ktoré sa majú odhadnúť. [Funkciou nech je I = f (α, β, koncentrácia) a použijú sa definičné vzťahy f (α, β, EC_{10}) = 0,1 a f (α, β, EC_{50}) = 0,5, aby sa nahradila f (α, β, koncentrácia) ekvivalentnou funkciou g (EC_{10}, EC_{50}, koncentrácia).

Priamejší výpočet (Andersen a kol., 1998) sa vykoná ponechaním pôvodnej rovnice a použitím Taylorovej expanzie okolo stredných hodnôt r_i a r_0.

V poslednom čase sa stala populárnou metóda ‚bootstrap'. Tieto metódy používajú namerané údaje a generátor náhodných čísel riadeného častého opätovného odberu vzoriek na odhad empirickej distribúcie rozptylu.

LITERATÚRA

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

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

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

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

4. Kapitola C.11 sa nahrádza takto:

„C.11. **AKTIVOVANÝ KAL, TEST RESPIRAČNEJ INHIBÍCIE (OXIDÁCIA UHLÍKA A AMÓNNYCH IÓNOV)**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 209 (2010). Táto testovacia metóda opisuje metódu stanovenia účinkov chemikálie na mikroorganizmy z aktivovaného kalu (väčšinou baktérie) meraním ich rýchlosti spotreby kyslíka (oxidácie uhlíka a/alebo amónnych iónov) v definovaných podmienkach a v prítomnosti rozličných koncentrácií testovanej chemikálie. Testovacia metóda je založená na teste ETAD (ekologické a toxikologické združenie odvetvia výroby farbív) (1) (2), na predchádzajúcom usmernení OECD TG 209 (3) a na revidovanej norme ISO 8192 (4). Účelom tohto testu je poskytnúť metódu rýchleho skríningu na posúdenie účinkov chemikálií na mikroorganizmy aktivovaného kalu z biologického (aeróbneho) stupňa čistiarní odpadových vôd. Výsledky testu môžu slúžiť aj ako ukazovateľ vhodných neinhibičných koncentrácií testovaných chemikálií použiteľných v testoch biodegradovateľnosti (napr. kapitoly C.4 A – F, C.9, C.10, C.12 a C.29 tejto prílohy, OECD TG 302 C). V tomto prípade sa test môže vykonať ako skríningový test, podobne ako test na vyhľadávanie rozsahu alebo limitný test (pozri bod 39), pričom sa berie do úvahy iba celková respirácia. Tieto informácie by sa však mali posudzovať opatrne v prípade testov ľahkej biodegradovateľnosti (kapitola C.4 A – F a C.29 tejto prílohy), pre ktoré je koncentrácia inokula výrazne nižšia než koncentrácia používaná v tejto testovacej metóde. Nedostatočná inhibícia v tomto respiračnom teste však neznamená automaticky neinhibičné podmienky testu ľahkej biodegradovateľnosti podľa kapitoly C.4 A – F alebo C.29 tejto prílohy.

2. Celkovo sa zdá, že test respiračnej inhibície sa od prvého publikovania úspešne používa, no v niektorých prípadoch boli zaznamenané nesprávne výsledky, napríklad (2) (4) (5). Respiračné krivky súvisiace s koncentráciou sú niekedy dvojfázové, diagramy vzťahu medzi dávkou a reakciou skreslené a hodnoty EC_{50} nečakane nízke (5). Prešetrovania ukázali, že takéto výsledky sa dosahujú, ak použitý aktivovaný kal výrazne nitrifikuje a testovaná chemikália má väčší účinok na oxidáciu amónnych iónov ako na všeobecnú heterotrofnú oxidáciu. Preto je možné tieto nesprávne výsledky prekonať vykonaním doplnkových testov použitím špecifického inhibítora nitrifikácie. Na základe merania miery spotreby kyslíka v prítomnosti a v neprítomnosti takého inhibítora, napríklad *N*-alylthomočoviny (ATU), sa môžu osobitne vypočítať miery celkovej, heterotrofnej a nitrifikačnej spotreby kyslíka (4) (7) (8). Umožní to stanoviť inhibičné účinky testovanej chemikálie na tieto dva procesy a vypočítať hodnoty EC_{50} tak pre oxidáciu organického uhlíka (heterotrofnú), ako aj amónnych iónov (nitrifikáciu) zvyčajným spôsobom. Je potrebné si uvedomiť, že v niektorých zriedkavých prípadoch môže byť inhibičný účinok *N*-alyltiomočoviny čiastočne alebo úplne anulovaný v dôsledku vytvárania komplexov s testovanými chemikáliami alebo doplnkami média, napríklad iónmi Cu^{++} (6). Ióny Cu^{++} sú nevyhnutné pre baktérie *Nitrosomonas*, no vo vyššej koncentrácii sú toxické.

3. Potreba nitrifikácie v aeróbnom čistení odpadových vôd ako nevyhnutný krok v procese odstraňovania zlúčenín dusíka z odpadových vôd denitrifikáciou na plynné produkty, sa stala naliehavou najmä v európskych krajinách. EÚ stanovila dolné limity koncentrácie dusíka vo vyčistených výtokoch vypúšťaných do zberných vôd ([1]).

4. Na väčšinu účelov postačuje samotná metóda posúdenia účinku na procesy oxidácie organického uhlíka. V niektorých prípadoch je však na interpretáciu výsledkov a pochopenie účinkov potrebné preskúmanie účinku na samotnú nitrifikáciu, alebo na nitrifikáciu a oxidáciu organického uhlíka zvlášť.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

5. Rýchlosť spotreby kyslíka aktivovaného kalu vyživovaného syntetickou odpadovou vodou sa meria v uzavretej komore obsahujúcej kyslíkovú elektródu po kontaktnom čase 3 hodiny. So zreteľom na reálny expozičný scenár by vyhovovali dlhšie kontaktné časy. Ak testovaná chemikália rýchlo degraduje, napríklad abioticky prostredníctvom hydrolýzy, alebo je prchavá a koncentráciu nie je možné primerane udržiavať, je možné použiť kratší čas expozície napr. 30 minút. Citlivosť každej dávky aktivovaného kalu by sa mala v deň expozície overiť pomocou vhodnej referenčnej chemikálie. Test sa spravidla používa na stanovenie koncentrácie EC_x (napr. EC_{50}) testovanej chemikálie a/alebo koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC).

6. Inhibícia spotreby kyslíka mikroorganizmami oxidujúcimi organický uhlík sa môže osobitne vyjadriť zo spotreby kyslíka mikroorganizmami oxidujúcimi amónne ióny meraním rýchlostí spotreby kyslíka v prítomnosti i neprítomnosti *N*-alyltiomočoviny – špecifického inhibítora oxidácie amónnych iónov na dusitany primárnymi nitrifikačnými baktériami. V tomto prípade sa percentuálna inhibícia rýchlosti spotreby kyslíka vypočíta porovnaním rýchlosti spotreby kyslíka v prítomnosti testovanej chemikálie so strednou hodnotou spotreby kyslíka zodpovedajúcich kontrolných vzoriek neobsahujúcich testovanú chemikáliu, a to tak v prítomnosti, ako aj v neprítomnosti špecifického inhibítora *N*-alyltiomočoviny.

7. Akákoľvek spotreba kyslíka vyplývajúca z abiotických procesov sa môže zistiť stanovením miery spotreby v zmesiach testovanej chemikálie, syntetickej odpadovej vody a vody, bez aktivovaného kalu.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

8. Na to, aby bolo možné správne interpretovať výsledky, mala by byť známa identifikácia testovanej chemikálie (najlepšie číslo CAS), jej názov (IUPAC), čistota, rozpustnosť vo vode, tlak pary, prchavosť a adsorpčné vlastnosti. Prchavé látky spravidla nie je možné primerane testovať, pokiaľ sa neprijmú osobitné opatrenia (pozri bod 21).

([1]) Smernica Rady 91/271/EHS z 21. mája 1991 o čistení komunálnych odpadových vôd. Ú. v. ES L 135, 30.5.1991, s. 40.

POUŽITEĽNOSŤ TESTOVACEJ METÓDY

9. Testovacia metóda sa môže použiť na chemikálie rozpustné vo vode, slabo rozpustné a prchavé. Nie vždy je však možné získať hodnoty EC_{50} v prípade látok s obmedzenou rozpustnosťou a platné výsledky v prípade prchavých látok je možné dosiahnuť len tak, že časť (napr. > 80 %) testovanej chemikálie zostane v reakčnej zmesi na konci expozičného času, resp. časov. Ak existuje akákoľvek neistota týkajúca sa stability testovanej chemikálie alebo jej prchavosti, mali by sa na spresnenie koncentrácie EC_x predložiť doplňujúce podporné analytické údaje.

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

10. Referenčné chemikálie by sa mali pravidelne testovať s cieľom zabezpečiť, aby boli testovacia metóda a testovacie podmienky spoľahlivé a skontrolovať citlivosť každej dávky aktivovaného kalu, ktorý sa používa ako mikrobiálne inokulum, v deň expozície. Ako referenčná inhibičná látka sa odporúča 3,5-dichlórfenol (3,5-DCP), keďže ide o známy inhibítor respirácie, ktorý sa používa na mnohé typy testov inhibície/toxicity (4). Ako referenčná chemikália pre test inhibície celkovej respirácie sa môže použiť aj pentahydrát síranu meďnatého (9). Ako osobitný referenčný inhibítor nitrifikácie je možné použiť *N*-metylanilín (4).

KRITÉRIÁ PLATNOSTI A REPRODUKOVATEĽNOSŤ

11. Rchlosť spotreby kyslíka slepými kontrolnými vzorkami (bez testovanej alebo referenčnej chemikálie) by nemala byť nižšia ako 20 mg kyslíka na gram aktivovaného kalu (sušiny suspendovaných tuhých látok) za hodinu. Ak je táto miera nižšia, test by sa mal zopakovať s premytým aktivovaným kalom alebo s kalom z iného zdroja. Variačný koeficient rýchlosti spotreby kyslíka v kontrolných replikátoch by nemal byť vyšší ako 30 % na konci konečného testu.

12. V rámci medzinárodnej porovnávacej skúšky, ktorú v roku 2004 zorganizovala Medzinárodná organizácia pre normalizáciu ISO (4) s použitím aktivovaného kalu získaného z odpadových vôd z domácností, sa zistilo, že hodnoty EC_{50} látky 3,5-DCP sú v rozsahu od 2 do 25 mg/l pre celkovú respiráciu, 5 až 40 mg/l pre heterotrofnú respiráciu a 0,1 až 10 mg/l pre nitrifikačnú respiráciu. Ak hodnota EC_{50} látky 3,5-DCP neleží v očakávanom rozsahu, test by sa mal zopakovať s aktivovaným kalom z iného zdroja. Hodnota EC_{50} pentahydrátu síranu meďnatého by mala byť v rozsahu od 53 do 155 mg/l pre celkovú respiráciu (9).

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Testovacie nádoby a zariadenie

13. Používať by sa malo bežné laboratórne zariadenie a toto vybavenie:

a) testovacie nádoby – napríklad 1 000 ml kadičky obsahujúce 500 ml reakčnej zmesi (pozri bod 5 na obrázku 1);

b) komora s príslušenstvom na meranie koncentrácie rozpusteného kyslíka; vhodná kyslíková elektróda; uzavretá komora obsahujúca vzorku, bez voľného priestoru a s registračným prístrojom (napr. body 7, 8, 9 na obrázku 1 v dodatku 2); alternatívne sa môže použiť BOD fľaša s vhodným manžetovým adaptérom na upevnenie kyslíkovej elektródy na hrdlo fľaše (obrázok 2 v dodatku 3). S cieľom zabrániť strate kvapaliny odobratej pri vložení kyslíkovej elektródy je vhodné najskôr vložiť cez manžetu lievik alebo sklenenú trubicu, alebo použiť nádoby so žliabkovou obrubou. V obidvoch prípadoch by sa malo použiť magnetické miešadlo alebo alternatívna metóda miešania, napríklad sonda s automatickým miešaním;

c) magnetické miešadlá a snímače pokryté inertným materiálom, na použitie v meracej komore a/alebo v testovacích nádobách;

d) prevzdušňovacie zariadenie: v prípade potreby by sa mal vháňať stlačený vzduch cez vhodný filter na odstránenie prachu a oleja a cez premývacie fľaše s vodou na zvlhčovanie vzduchu. Obsah nádob by sa mal prevzdušňovať Pasteurovými pipetami alebo inými prevzdušňovacími zariadeniami, ktoré neadsorbujú chemikálie. Na zabezpečenie spotreby kyslíka pre kal a prekonanie ťažkostí s chemikáliami, ktoré produkujú nadmerné množstvo peny, sú prchavé, a tým vytvárajú straty, alebo sa ťažko rozptyľujú pri prevzdušňovaní vháňaním vzduchu, sa môže použiť orbitálna trepačka s prevádzkovou rýchlosťou rotácie 150 – 250 ot/min a s bankami s objemom napríklad 2 000 ml. Testovací systém tvoria spravidla viaceré kadičky, ktoré sa sústavne prevzdušňujú a postupne používajú (napr. v intervaloch približne 10 – 15 minút), a potom sa postupne analyzujú. Použiť sa môžu aj schválené zariadenia, ktoré umožňujú súčasné prevdzušňovanie a meranie rýchlosti spotreby kyslíka v zmesiach;

e) pH-meter;

f) odstredivka, spravidla stolná odstredivka na kal s odstredivým zrýchlením 10 000 m/s².

Reagenty

14. Používať by sa mali výlučne reagenty analytickej čistoty.

Voda

15. Používať by sa mala destilovaná alebo deionizovaná voda obsahujúca menej ako 1 mg/l rozpusteného organického uhlíka (DOC), s výnimkou prípadov, keď sa vyžaduje voda z vodovodu bez chlóru.

Zdroj syntetickej odpadovej vody

16. Médium by sa malo pripraviť tak, aby obsahovalo tieto zložky v uvedených množstvách:

— peptón	16 g
— mäsový extrakt (alebo porovnateľný zeleninový extrakt)	11 g
— močovina	3 g
— chlorid sodný (NaCl)	0,7 g
— dihydrát chloridu vápenatého ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— heptahydrát síranu horečnatého ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— hydrogénfosforečnan didraselný bezvodý (K_2HPO_4)	2. 8 g
— destilovaná alebo deionizovaná voda na 1 liter.	

17. Hodnota pH tohto roztoku by mala byť 7,5 ± 0,5. Ak sa pripravené médium nepoužije okamžite, malo by sa skladovať na tmavom mieste pri teplote 0 – 4 °C, nie dlhšie ako jeden týždeň, alebo za podmienok, ktoré nemenia jeho zloženie. Je potrebné si uvedomiť, že táto odpadová voda má stonásobne vyššiu koncentráciu, než je opísané v Technickej správe OECD: ‚*Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents*' (Navrhnuté metódy stanovovania biodegradovateľnosti surfaktantov používaných v syntetických detergentoch, 11. jún 1976) a navyše s pridaným hydrogénfosforečnanom didraselným.

18. Alternatívne sa zložky média môžu pred uskladnením jednotlivo sterilizovať, prípadne sa peptón a mäsový extrakt môžu pridať krátko pred vykonaním testu. Pred použitím by sa médium malo dôkladne premiešať a jeho pH v prípade potreby upraviť na hodnotu 7,5 ± 0,5.

Testovaná chemikália

19. Pre testované látky ľahko rozpustné vo vode by sa mal pripraviť zásobný roztok iba do maximálnej rozpustnosti vo vode (zrážania nie sú prípustné). Látky slabo rozpustné vo vode, zmesi so zložkami s rôznou rozpustnosťou vo vode a adsorpčné látky by sa mali odvážiť priamo do testovacích nádob. V týchto prípadoch môže byť alternatívou použitie zásobných roztokov, ak sa analyticky stanovia koncentrácie rozpustených testovaných chemikálií v testovacích nádobách (pred pridaním aktivovaného kalu). Analytické stanovenie koncentrácií rozpustených testovaných chemikálií v testovacích nádobách je dôležité aj v prípade, že sa majú pripraviť vode prispôsobené frakcie (*water accommodated fraction* – WAF). Vyhnúť sa treba použitiu organických rozpúšťadiel, dispergačných činidiel/emulgátorov na zlepšenie rozpustnosti. Použitie ultrazvuku v prípade zásobných roztokov a suspenzií pred miešaním, napríklad počas noci, je možné vtedy, ak sú k dispozícii primerané informácie týkajúce sa stability testovanej látky za takýchto podmienok.

20. Testovaná chemikália môže nepriaznivo ovplyvniť pH v testovacom systéme. Hodnota pH zmesí s aplikovanou testovanou chemikáliou by sa mala stanoviť predbežnou skúškou pred začiatkom testu, aby sa zistilo, či bude potrebná úprava pH pred hlavným testom a potom opäť v deň hlavného testu. V prípade potreby by sa mali roztoky/suspenzie testovanej látky vo vode neutralizovať pred pridaním inokula. Keďže však neutralizácia môže zmeniť chemické vlastnosti chemikálie, v závislosti od účelov štúdie je možné vykonať ďalšie testovanie na posúdenie účinku testovanej chemikálie na kal bez úpravy pH.

21. Toxické účinky prchavých chemikálií, najmä pri testoch, v rámci ktorých sa vzduch nechá prebublávať cez systém, môžu mať premenlivú úroveň, k čomu dochádza v dôsledku strát látky počas expozície. V prípade takýchto látok by sa malo postupovať obozretne a mali by sa vykonávať osobitné analýzy kontrolných zmesí obsahujúcich danú látku a úpravy režimu prevzdušňovania.

Referenčná chemikália

22. Ak sa ako referenčná chemikália používa 3,5-dichlórfenol, je potrebné pripraviť roztok 1 g 3,5-dichlórfenolu v 1 000 ml vody (15). Na urýchlenie rozpúšťania by sa mala použiť teplá voda a/alebo pôsobenie ultrazvuku a po ochladení na izbovú teplotu sa roztok doplní na príslušný objem. Je však potrebné zabezpečiť, aby sa referenčná látka štrukturálne nezmenila. Hodnota pH roztoku by sa mala prekontrolovať a v prípade potreby upraviť pomocou NaOH alebo H_2SO_4 na pH 7 – 8.

23. Ak sa ako referenčná chemikália používa pentahydrát síranu meďnatého, pripravia sa koncentrácie 58 mg/l, 100 mg/l a 180 mg/l (faktor 1,8). Látka sa odváži priamo do testovacích nádob (29 – 50 – 90 mg na 500 ml celkového objemu). Potom sa rozpustí v 234 ml vody z vodovodu ošetrenej v autokláve. Pentahydrát síranu meďnatého je ľahko rozpustný. Na začiatku testu sa pridá 16 ml syntetického odpadovej vody a 250 ml aktivovaného kalu.

Osobitný inhibítor nitrifikácie

24. Pripraviť by sa mal zásobný roztok 2,32 g/l *N*-alyltiomočoviny (ATM). Pridaním 2,5 ml tohto zásobného roztoku do inkubačnej zmesi s konečným objemom 500 ml sa dosiahne konečná koncentrácia 11,6 mg ATM/l (10^{-4} mol/l), ktorá je preukázateľne dostatočná (4) na to, aby spôsobila 100 % inhibíciu nitrifikácie aktivovaného kalu s obsahom 1,5 g/l suspendovaných tuhých látok.

Abiotické kontrolné vzorky

25. Za určitých výnimočných podmienok môže testovaná chemikália so silne redukčnými vlastnosťami spôsobiť merateľnú abiotickú spotrebu kyslíka. V takých prípadoch sú potrebné abiotické kontrolné vzorky, aby sa rozlišovalo medzi abiotickou spotrebou kyslíka v prípade testovanej látky a mikrobiálnou respiráciou. Abiotické kontrolné vzorky sa môžu pripraviť vynechaním inokula z testovacej zmesi. Podobne sa môžu abiotické kontrolné vzorky bez inokula použiť na vykonanie podporných analytických meraní na účely stanovenia dosiahnutej koncentrácie počas expozičnej fázy testu napr. pri používaní zásobných roztokov chemikálií zle rozpustných vo vode, ktorých zložky majú rôznu rozpustnosť vo vode. V osobitných prípadoch môže byť potrebné pripraviť abiotickú kontrolnú vzorku so sterilizovaným inokulom (napr. pomocou autoklávu alebo pridaním sterilizujúcich toxických látok). Niektoré chemikálie môžu produkovať alebo spotrebúvať kyslík, len ak je povrchová plocha dostatočne veľká na reakciu, a to aj v prípade, že za normálnych okolností na to potrebujú oveľa vyššie hodnoty teploty a tlaku. Osobitná pozornosť by sa v tejto súvislosti mala venovať látkam peroxidovej skupiny. Sterilizované inokulum poskytuje veľkú povrchovú plochu.

Inokulum

26. Na všeobecné použitie by sa mal aktivovaný kal odoberať z miesta výstupu prevzdušňovacej nádrže alebo z miesta v blízkosti výstupu nádrže správne pracujúcej čistiarne odpadových vôd, ktorá spracováva prevažne odpadové vody z domácností. V závislosti od účelu testu sa pri vhodnej koncentrácii suspendovaných tuhých látok od 2 do 4 g/l môžu použiť aj iné vhodné druhy alebo zdroje aktivovaného kalu, napríklad kal kultivovaný v laboratóriu. Kaly z rôznych čistiarní odpadových vôd však môžu vykazovať rôzne vlastnosti a rôznu citlivosť.

27. Kal sa môže používať v stave, v akom sa odoberie, no hrubé častice by sa mali odstrániť krátkodobým usadzovaním, napríklad 5 – 15 minút, a následným odliatím vrchnej vrstvy jemnejších tuhých častíc, alebo preosievaním (napr. sitom s veľkosťou otvorov 1 mm^2). Alternatívne sa kal môže homogenizovať v miešadle približne 15 sekúnd alebo dlhšie.Potrebná je však opatrnosť, pokiaľ ide o použitú silu a o zmenu teploty, ktorá by mohla nastať počas dlhého miešania.

28. Často je potrebné premývanie kalu, napríklad ak je rýchlosť endogénej spotreby kyslíka nízka. Kal by sa mal najskôr odstreďovať v čase potrebnom na vytvorenie čistého supernatantu a pelety tuhých látok z odpadovej vody, napríklad 10 minút pri odstredivom zrýchlení približne 10 000 m/s². Supernatant by sa mal odstrániť a kal resuspendovať vo vode z vodovodu bez chlóru, pri súčasnom pretrepávaní, pričom premývacia voda by sa mala následne odstrániť opätovným odstreďovaním. Proces premývania a odstreďovania by sa mal v prípade potreby opakovať. Stanoviť by sa mala suchá hmotnosť známeho objemu resuspendovaného kalu a kal by sa mal koncentrovať odstránením kvapaliny alebo ďalej riediť vo vode z vodovodu bez chlóru, aby sa dosiahla požadovaná koncentrácia tuhých látok kalu 3 g/l. Aktivovaný kal by sa mal nepretržite prevzdušňovať (napr. prietokom 2 l/minútu) pri testovacej teplote, a ak je to možné, použiť v deň odberu. Ak to nie je možné, kal by sa mal v priebehu nasledujúcich dvoch dní denne vyživovať zdrojom syntetickej odpadovej vody (50 ml zdroja syntetickej odpadovej vody/liter aktivovaného kalu). Kal sa potom použije na test a výsledky sa považujú za platné za predpokladu, že nenastali žiadne výrazné zmeny v jeho aktivite z hľadiska rýchlosti endogénnej heterotrofnej a nitrifikačnej spotreby kyslíka.

29. Ťažkosti môžu vzniknúť, ak počas inkubácie dochádza k peneniu do takej miery, že pena a tuhé látky kalu, ktoré sa na nej nesú, sú vytláčané z prevzdušňovacích nádob. Penenie môže byť niekedy spôsobené prítomnosťou syntetickej odpadovej vody, no s penením treba počítať, ak je testovaná chemikália povrchovo aktívnou látkou, alebo povrchovo aktívnu látku obsahuje. Strata tuhých látok v kale z testovaných zmesí povedie k umelo zníženým rýchlostiam spotreby kyslíka, čo by sa mohlo nesprávne vykladať ako výsledok inhibície. Prevzdušňovaním roztoku povrchovo aktívnej látky sa navyše povrchovo aktívna látka koncentruje vo vrstve peny a stratou peny z testovacieho systému sa znížia expozičné koncentrácie. Penenie je možné kontrolovať jednoduchými mechanickými metódami (napr. občasným ručným miešaním pomocou sklenenej tyčinky) alebo pridaním emulzie silikónového protipenového činidla bez obsahu povrchovo aktívnej látky a/alebo použitím metódy prevdzušňovania trepačkovej banky. Ak problém súvisí s prítomnosťou syntetickej odpadovej vody, malo by sa upraviť jej zloženie použitím protipenového činidla v pomere napríklad 50 µl/liter. Ak penenie spôsobuje testovaná chemikália, množstvo potrebné na zníženie tohto účinku by sa malo stanoviť pri najvyššej testovacej koncentrácii. Potom by sa mali rovnako ošetriť všetky jednotlivé prevzdušňovacie nádoby (vrátane tých nádob, napríklad slepých kontrolných a referenčných nádob, v ktorých sa pena netvorí). Ak sa používajú protipenové činidlá, nemalo by dochádzať k žiadnej interakcii s inokulom a/alebo testovanou chemikáliou.

POSTUP SKÚŠKY

30. Stanoviť sa môže inhibícia troch rôznych druhov spotreby kyslíka, celkovej, iba heterotrofnej a spotreby v dôsledku nitrifikácie. Za normálnych okolností by malo postačovať meranie inhibície celkovej spotreby kyslíka. Účinky oxidácie organického uhlíka a oxidácie amónnych solí na heterotrofnú spotrebu kyslíka sú potrebné v prípade, že existuje osobitná požiadavka na tieto dva samostatné parametre pre konkrétnu chemikáliu, alebo (ako alternatíva) ak je potrebné objasniť atypické krivky závislosti odozvy od dávky na základe inhibície celkovej spotreby kyslíka.

Podmienky testu

31. Test by sa mal vykonávať pri teplote v rozsahu 20 ± 2 °C.

Testovacie zmesi

32. Testovacie zmesi (F_T ako v tabuľke 1), ktoré obsahujú vodu, syntetickú odpadovú vodu a testovanú chemikáliu, by sa mali pripraviť tak, aby sa dosiahli rôzne nominálne hodnoty koncentrácie testovanej chemikálie (príklad objemov zložiek je uvedený v tabuľke 1). Hodnota pH by sa mala v prípade potreby upraviť na 7,5 ± 0,5. Zmesi by sa mali zriediť vodou a malo by sa pridať inokulum tak, aby sa dosiahol rovnaký konečný objem v nádobách a aby sa začalo prevzdušňovanie.

Referenčné zmesi

33. Zmesi (F_R) by sa mali pripravovať rovnakým spôsobom ako testovacie zmesi, a to s referenčnou chemikáliou, napríklad 3,5-dichlórfenolom, namiesto testovanej chemikálie.

Slepé kontrolné vzorky

34. Slepé kontrolné vzorky (F_B) by sa mali pripravovať na začiatku a na konci expozície v rámci testov, pri ktorých sa testovacie kadičky pripravujú postupne v určitých intervaloch. V testoch vykonaných s použitím vybavenia, ktoré umožňuje súbežné merania spotreby kyslíka, by sa mali do každej série paralelných analýz začleniť najmenej dve slepé kontrolné vzorky. Slepé kontrolné vzorky obsahujú rovnaké množstvo aktivovaného kalu a syntetického média, ale neobsahujú testovanú ani referenčnú chemikáliu. Zriediť by sa mali vodou na rovnaký objem, ako majú testovacie a referenčné zmesi.

Abiotické kontrolné vzorky

35. V prípade potreby, napríklad ak je známe alebo sa predpokladá, že testovaná chemikália má silne redukčné vlastnosti, by sa na meranie abiotickej spotreby kyslíka mala pripraviť zmes F_A. Zmes by mala obsahovať rovnaké množstvo testovanej chemikálie, syntetickej odpadovej vody a mala by mať rovnaký objem ako testovacie zmesi, no nemala by obsahovať aktivovaný kal.

Všeobecný postup a merania

36. Testovacie zmesi, referenčné zmesi a slepé a abiotické kontrolné vzorky sa inkubujú pri skúšobnej teplote v podmienkach núteného prevzdušňovania (0,5 – 1 l/min), aby sa koncentrácia rozpusteného kyslíka udržiavala nad úrovňou 60 – 70 % saturácie a aby sa v suspenzii udržali vločky kalu. Na to, aby sa v suspenzii vločky kalu udržali, je potrebné aj miešanie kultúr. Za začiatok inkubácie sa považuje počiatočný kontakt inokula aktivovaného kalu s ostatnými zložkami konečnej zmesi. Na konci inkubácie, po stanovenom čase expozície zvyčajne v dĺžke troch hodín, sa odoberú vzorky na meranie miery zníženia koncentrácie rozpusteného kyslíka v komore navrhnutej na tento účel (obrázok 2 v dodatku 3) alebo v úplne plnej fľaši BOD. Spôsob, akým sa inkubácia začne, závisí aj od vlastností zariadenia použitého na meranie rýchlostí spotreby kyslíka. Napríklad, ak je jeho súčasťou jedna kyslíková sonda, merania sa vykonávajú samostatne. V tom prípade by sa mali pripraviť rôzne zmesi potrebné na test v syntetickej odpadovej vode, no vynechať by sa malo inokulum, a do každej nádoby zo série by sa mali pridať príslušné časti kalu. Následne by sa každá inkubácia mala začať vo vhodne načasovaných intervaloch napr. 10 – 15 minút. Alternatívne môžu byť súčasťou meracieho systému viaceré sondy, ktoré uľahčia súbežné vykonávanie viacerých meraní. V tom prípade sa môže inokulum pridať súčasne do príslušných skupín nádob.

37. Nominálna hodnota koncentrácie aktivovaného kalu vo všetkých testovacích, referenčných a slepých (ale nie abiotických kontrolných) zmesiach je 1,5 g/l suspendovaných tuhých látok. Spotreba kyslíka by sa mala merať po troch hodinách expozície. Podľa potreby by sa mali po 30-minútovej expozícii vykonať doplnkové merania opísané v bode 5.

Nitrifikačný potenciál kalu

38. Na to, aby bolo možné rozhodnúť, či kal nitrifikuje, a ak áno, do akej miery, by sa mali pripraviť zmesi (F_B) ako slepé kontrolné zmesi a doplnkové ‚kontrolné' zmesi (F_N), ktoré však obsahujú aj *N*-alyltiomočovinu s koncentráciou 11,6 mg/l. Zmesi by sa mali prevzdušňovať a inkubovať pri teplote 20° ± 2 °C počas troch hodín. Potom by sa mali zmerať rýchlosti spotreby kyslíka a vypočítať rýchlosť spotreby kyslíka spôsobená nitrifikáciou.

Koncepcie testov

Test na vyhľadávanie rozsahu

39. Predbežná skúška sa v prípade potreby používa na odhadnutie rozsahu koncentrácií testovanej chemikálie potrebných pri konečnom teste na stanovenie inhibície spotreby kyslíka. Ak počas predbežnej skúšky nedochádza k inhibícii spotreby kyslíka testovanou chemikáliou, môže to znamenať, že konečný test nie je potrebný. Mali by sa však vykonať tri opakované merania s najvyššou testovacou koncentráciou v rámci predbežnej skúšky (spravidla 1 000 mg/l, ale závisí to od požadovaných údajov).

Tabuľka 1

Príklady zmesí pre predbežnú skúšku

Reagenty	Pôvodná koncentrácia				
Zásobný roztok testovanej chemikálie	10 g/l				
Zásobný roztok syntetického média	pozri bod 16				
Zásobná suspenzia aktivovaného kalu	3 g/l suspendovaných tuhých látok				
Zložky zmesí	Dávkovanie do testovacích nádob [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Zásobný roztok testovanej chemikálie (ml) (body 19 až 21)	0,5	5	50	0	50
Zásobný roztok zdroja syntetickej odpadovej vody (ml) (bod 16)	16	16	16	16	16
Suspenzia aktivovaného kalu (ml) (body 26 až 29)	250	250	250	250	0
Voda (bod 15)	233,5	229	184	234	434
Celkový objem zmesí (ml)	500	500	500	500	500
Koncentrácie v zmesi					
Testovacia suspenzia (mg/l) Aktivovaný kal	10	10	1 000	0	1 000
(suspendované tuhé látky) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] Ten istý postup by sa mal dodržať pri príprave referenčnej chemikálie v bankách F_{R1-3}.

40. Test by sa mal vykonať použitím najmenej troch koncentrácií testovanej chemikálie, napríklad 10 mg/l, 100 mg/l a 1 000 mg/l, so slepou kontrolnou vzorkou a v prípade potreby s najmenej tromi abiotickými kontrolnými vzorkami s najvyššími koncentráciami testovanej chemikálie (pozri príklad v tabuľke 1). V ideálnom prípade by najnižšia koncentrácia nemala mať žiadny účinok na spotrebu kyslíka. V prípade potreby by sa mali vypočítať rýchlosti spotreby kyslíka a rýchlosť nitrifikácie a následne percentuálna hodnota inhibície. V závislosti od účelu testu je tiež možné jednoducho stanoviť toxicitu hraničnej hodnoty koncentrácie, napríklad 1 000 mg/l. Ak sa pri tejto koncentrácii nezistí žiadny štatisticky významný toxický účinok, ďalšie testovanie pri vyšších alebo nižších koncentráciách nie je potrebné. Treba si uvedomiť, že látky slabo rozpustné vo vode, zmesi so zložkami s rôznou rozpustnosťou vo vode a adsorpčné látky by sa mali odvážiť priamo do testovacích nádob. V tomto prípade by sa objem vyhradený pre zásobný roztok testovanej látky mal nahradiť vodou na zriedenie.

Konečný test

Inhibícia celkovej spotreby kyslíka

41. Test by sa mal vykonať s použitím rôznych koncentrácií stanovených na základe predbežnej skúšky. Na získanie hodnôt koncentrácií NOEC a EC_x (napr. EC_{50}) sa vo väčšine prípadov odporúča použiť šesť koncentrácií kontrolných vzoriek a päť koncentrácií vzoriek s aplikovanou chemikáliou, v geometrickom rade s piatimi replikátmi. Merania abiotických kontrolných vzoriek nie je potrebné opakovať, ak počas predbežnej skúšky nedošlo k spotrebe kyslíka. Ak sa však zistí výrazná spotreba kyslíka, abiotické kontrolné vzorky by sa mali použiť pre každú koncentráciu testovanej chemikálie. Citlivosť kalu by sa mala skontrolovať pomocou referenčnej chemikálie 3,5-dichlórfenol. Kontrola citlivosti kalu by sa mala vykonať pre každú testovaciu sériu, keďže je známe, že hodnota citlivosti kolíše. Vo všetkých prípadoch sa vzorky odoberú z testovacích nádob po 3 hodinách a v prípade potreby po ďalších 30 minútach na meranie rýchlosti spotreby kyslíka v komore s kyslíkovou elektródou. Zo získaných údajov sa vypočítajú špecifické hodnoty rýchlosti spotreby kyslíka v prípade kontrolných a testovacích zmesí. Následne sa z rovnice 7 vypočíta percentuálna inhibícia.

Rozlišovanie medzi inhibíciou heterotrofnej respirácie a nitrifikácie

42. Použitie špecifického inhibítora nitrifikácie – ATM – umožňuje priame posúdenie inhibičných účinkov testovanej chemikálie na heterotrofnú oxidáciu. Účinky na mieru nitrifikácie je možné vypočítať ako rozdiel celkovej spotreby kyslíka (bez prítomnosti ATM) a spotreby kyslíka v prítomnosti ATU. Pripraviť by sa mali dva súbory reakčných zmesí podľa koncepcie testu pre koncentrácie EC_x alebo NOEC opísané v bode 41. Okrem toho by sa však mal inhibítor ATM pridať do každej zmesi jedného súboru s konečnou koncentráciou 11,6 mg/l, pri ktorej sa preukázala úplná inhibícia nitrifikácie v kale so suspendovanými tuhými látkami pri koncentráciách do 3 000 mg/l (4). Spotreba kyslíka by sa mala merať po uplynutí času expozície. Tieto priamo získané hodnoty predstavujú iba heterotrofnú respiráciu a rozdiely medzi nimi a zodpovedajúcimi hodnotami celkovej rýchlosti spotreby kyslíka zasa nitrifikáciu. Následne sa vypočítajú rôzne stupne inhibície.

Merania

43. Po uplynutí expozičného času, resp. časov by sa vzorka z prvej prevzdušňovacej nádoby mala presunúť do komory s kyslíkovou elektródou (obrázok 1 v dodatku 2) a okamžite by sa mala zmerať koncentrácia rozpusteného kyslíka. Ak je k dispozícii systém s viacerými elektródami, merania sa môžu vykonať súbežne. Dôležité je miešanie (pomocou zabudovaného magnetu) rovnakou rýchlosťou ako pri kalibrovaní elektródy, aby sa zabezpečilo, že sonda reaguje na meniace sa koncentrácie kyslíka s minimálnym oneskorením a že sa umožní pravidelné a reprodukovateľné meranie kyslíka v meracej nádobe. Zvyčajne je vhodný systém niektorých kyslíkových elektród so sondou s automatickým miešaním. Komoru je potrebné medzi meraniami vypláchnuť vodou. Vzorka sa môže prípadne použiť na vyplnenie BOD fľaše (obrázok 2 v dodatku 3) vybavenej magnetickým miešadlom. Do hrdla fľaše by sa následne mala vložiť kyslíková sonda s manžetovým adaptérom a zapnúť magnetické miešadlo. V obidvoch prípadoch by sa mala priebežne merať a zaznamenávať koncentrácia rozpusteného kyslíka, zvyčajne 5 – 10 minút, alebo kým koncentrácia kyslíka neklesne pod 2 mg/l. Elektróda by sa potom mala odobrať, zmes vrátiť späť do prevzdušňovacej nádoby, a ak je potrebné meranie po dlhšej expozícii, malo by pokračovať prevzdušňovanie a miešanie.

Overovanie koncentrácie testovanej chemikálie

44. Na určité účely môže byť potrebné meranie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách. Treba si uvedomiť, že ak sa používajú zásobné roztoky:

— látok slabo rozpustných vo vode,

— zmesí so zložkami s rôznou rozpustnosťou vo vode alebo

— látok s dobrou rozpustnosťou vo vode, pričom koncentrácia zásobného roztoku sa približuje maximálnej rozpustnosti vo vode,

rozpustená frakcia nie je známa rovnako, ako nie je známa skutočná koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá sa presúva do testovacích nádob. Na to, aby bolo možné charakterizovať expozíciu, je potrebné analytické stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách. Na zjednodušenie postupu by sa malo analytické stanovenie vykonať pred pridaním inokula. Vzhľadom na skutočnosť, že do testovacích nádob sa presunú len rozpustené frakcie, môžu byť namerané hodnoty koncentrácie veľmi nízke.

45. S cieľom vyhnúť sa časovo náročným a nákladným analýzam sa odporúča jednoducho odvážiť testovanú chemikáliu priamo do testovacích nádob a na ďalšie výpočty použiť nominálne hodnoty koncentrácie zistené počiatočným vážením. Rozlišovanie medzi rozpustenými, nerozpustenými alebo adsorbovanými frakciami testovanej chemikálie nie je potrebné, lebo v reálnych podmienkach sa všetky tieto frakcie vyskytujú v čistiarni odpadových vôd rovnako, pričom sa môžu líšiť v závislosti od zloženia odpadových vôd. Cieľom tejto testovacej metódy je reálny odhad neinhibičnej koncentrácie, pričom metóda nie je vhodná na podrobné skúmanie, ktoré frakcie prispievajú k inhibícii organizmov aktivovaného kalu. Napokon, aj adsorbčné látky by sa mali odvážiť priamo do testovacích nádob a nádoby by mali byť silanizované, aby sa minimalizovali straty vzniknuté adsorbciou.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Výpočet rýchlostí spotreby kyslíka

46. Rýchlosti spotreby kyslíka by sa mali vypočítať z priemeru nameraných hodnôt, napríklad z lineárnej časti grafov závislosti koncentrácie kyslíka od času, pričom výpočet by sa mal obmedziť na koncentrácie kyslíka medzi 2,0 mg/l a 7,0 mg/l, keďže vyššie a nižšie koncentrácie môžu samy osebe ovplyvniť hodnoty miery spotreby. Niekedy je nevyhnutné a potrebné preskúmať aj pásma koncentrácií nižších alebo vyšších než sú uvedené hodnoty, napríklad ak je respirácia výrazne znížená, a preto veľmi pomalá, alebo ak daný aktivovaný kal respiruje veľmi rýchlo. To je prípustné za predpokladu, že rozšírené úseky krivky grafu spotreby sú rovné a ich sklon sa nemení pri prechode hranicami 2,0 mg/l alebo 7,0 mg/l O_2. Akýkoľvek zakrivený úsek grafu naznačuje, že merací systém sa stabilizuje alebo že sa spotreba mení, a nemali by sa používať na výpočet rýchlosti spotreby kyslíka. Rýchlosť spotreby kyslíka by sa mala vyjadriť v miligramoch na liter za hodinu (mg/lh) alebo v miligramoch na gram suchého kalu za hodinu (mg/gh). Rýchlosť spotreby kyslíka (R) v mg/lh sa môže vypočítať alebo interpolovať z lineárnej časti grafu zaznamenávajúceho pokles množstva kyslíka, podľa rovnice 1:

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

kde:

Q_1 je koncentrácia kyslíka na začiatku vybratého úseku lineárnej fázy (mg/l),

Q_2 je koncentrácia kyslíka na konci vybratého úseku lineárnej fázy (mg/l),

Δ_t je časový interval medzi týmito dvomi meraniami (min).

47. Špecifická rýchlosť spotreby kyslíka (R_S) sa vyjadrí ako množstvo spotrebovaného kyslíka na gram suchej hmotnosti kalu za hodinu (mg/gh) podľa rovnice 2:

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

kde SS je koncentrácia suspendovaných tuhých látok v testovacej zmesi (g/l).

48. Kombinovať sa môžu rôzne indexy R:

S špecifická rýchlosť spotreby kyslíka,

T celková rýchlosť spotreby kyslíka,

N rýchlosť ovplyvnená nitrifikačnou respiráciou,

H rýchlosť ovplyvnená heterotrofnou respiráciou,

A rýchlosť ovplyvnená abiotickými procesmi,

B rýchlosť na základe slepých vzoriek (stredná hodnota).

Výpočet rýchlosti spotreby kyslíka ovplyvnenej nitrifikáciou

49. Vzťah medzi celkovou rýchlosťou (R_T), nitrifikačnou respiráciou (RN) a heterotrofnou respiráciou (RH) je daný rovnicou 3:

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

kde:

R_N je rýchlosť spotreby kyslíka ovplyvnená nitrifikáciou (mg/lh),

R_T je rýchlosť spotreby kyslíka nameraná pomocou slepej kontrolnej vzorky bez ATM, F_B) (mg/lh),

R_H je rýchlosť spotreby kyslíka nameraná pomocou slepej kontrolnej vzorky s pridaním ATM (F_N) (mg/lh).

50. Tento vzťah platí pre hodnoty získané pomocou slepých vzoriek (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotických kontrolných vzoriek (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) a vzoriek s testovanými chemikáliami (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Konkrétne rýchlosti spotreby kyslíka sa vypočítajú z týchto vzťahov:

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

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

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

51. Ak je v rámci predbežnej skúšky hodnota R_N zanedbateľná (napr. < 5 % hodnoty R_T v slepých kontrolných vzorkách), je možné predpokladať, že heterotrofná spotreba kyslíka sa rovná celkovej spotrebe a že nedochádza k žiadnej nitrifikácii. Ak by sa na základe testov mali posudzovať vplyvy na heterotrofné a nitrifikačné mikroorganizmy, bol by potrebný alternatívny zdroj aktivovaného kalu. Konečný test sa vykoná, ak existuje dôkaz o zníženej spotrebe kyslíka pri rôznych koncentráciách testovanej chemikálie.

Výpočet percenta inhibície

52. Percentuálna inhibícia celkovej spotreby kyslíka (I_T) pri každej koncentrácii testovanej chemikálie sa vypočíta podľa rovnice 7:

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

53. Podobne sa vypočíta percentuálna inhibícia heterotrofnej spotreby kyslíka (I_H) pri každej koncentrácii testovanej chemikálie podľa rovnice 8:

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

54. A napokon inhibícia spotreby kyslíka ovplyvnenej nitrifikáciou (I_N) sa pri každej koncentrácii vypočíta podľa rovnice 9:

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

55. Mal by sa zostrojiť diagram závislosti percentuálnej inhibície spotreby kyslíka od logaritmu koncentrácie testovanej chemikálie (inhibičná krivka, pozri obrázok 3 v dodatku 4). Inhibičné krivky sa zostroja pre každé prevzdušňovanie v trvaní 3 hodín alebo po ďalších 30 minútach. Koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá vyvolá inhibíciu spotreby kyslíka o 50 % (EC_{50}), by sa mala vypočítať alebo interpolovať z grafu. Ak sú k dispozícii vhodné údaje, môžu sa vypočítať alebo interpolovať 95 % hranice spoľahlivosti pre koncentráciu EC_{50}, sklon krivky a vhodné hodnoty na označenie začiatku inhibície (napr. EC_{10} alebo EC_{20}) a konca rozsahu inhibície (napr. EC_{80} alebo EC_{90}).

56. Je potrebné si uvedomiť, že vzhľadom na premenlivosť často pozorovanú vo výsledkoch môže v mnohých prípadoch postačovať vyjadrenie výsledkov v rozsahu hodnôt, napríklad:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l až 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l až 100 mg/l

EC_{50} > 100mg/l

Interpretácia výsledkov

EC_x

57. Hodnoty EC_x vrátane ich príslušných horných a dolných 95 % hraníc spoľahlivosti pre daný parameter sa vypočítajú pomocou vhodných štatistických metód [napr. probitová analýza, logistická alebo Weibullova funkcia, upravená Spearman-Karberova metóda alebo jednoduchá interpolácia (11)]. Koncentrácia EC_x sa získa zadaním hodnoty, ktorá zodpovedá x % strednej hodnoty nameranej v kontrolnej vzorke, do príslušnej rovnice. Pri výpočte EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x by sa mali stredné hodnoty pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou (x) podrobiť regresnej analýze.

Odhad koncentrácie NOEC

58. Ak je cieľom štatistickej analýzy stanovenie koncentrácie NOEC, potrebné sú štatistické údaje pre každú nádobu (jednotlivé nádoby sa považujú za replikáty). Používať by sa mali vhodné štatistické metódy (podľa dokumentu OECD o súčasných prístupoch v štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návod na uplatňovanie (11). Vo všeobecnosti sa nepriaznivé účinky testovanej chemikálie v porovnaní s kontrolnými vzorkami skúmajú pomocou jednostranného (obmedzeného) testovania hypotéz pri hodnote $p \leq 0{,}05$.

Protokol o skúške

59. Protokol o skúške by mal obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, čistota,

— fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie [napr. log K_{ow}, rozpustnosť vo vode, tlak pár, Henryho konštanta (H) a prípadné informácie o osude testovanej chemikálie, napríklad o adsorpcii na aktivovanom kale].

Testovací systém

— zdroj, podmienky prevádzky čistiarne odpadových vôd a jej prítoku, koncentrácia, predúprava a údržba aktivovaného kalu.

Podmienky testu

— testovacia teplota, pH počas testu a trvanie expozičnej fázy, resp. fáz.

Výsledky

— konkrétna spotreba kyslíka v kontrolných vzorkách (mg O_2/g kalu × h),

— všetky namerané údaje, inhibičná krivka, resp. krivky a metóda výpočtu EC_{50},

— hodnota EC_{50}, a ak je to možné, 95 % hranice spoľahlivosti, prípadne hodnoty EC_{20}, EC_{80}; ak nie je možné stanoviť hodnotu EC_{50}, tak aj hodnotu NOEC a použité štatistické metódy,

— výsledky celkovej inhibície, a ak je to vhodné, heterotrofnej a nitrifikačnej inhibície,

— abiotická spotreba kyslíka vo fyzikálno-chemickej kontrolnej vzorke (ak sa používa),

— názov referenčnej chemikálie a výsledky dosiahnuté s touto chemikáliou,

— všetky pozorovania a odchýlky od štandardného postupu, ktoré by mohli ovplyvniť výsledky.

LITERATÚRA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto pojmy.

Chemikália je látka alebo zmes.

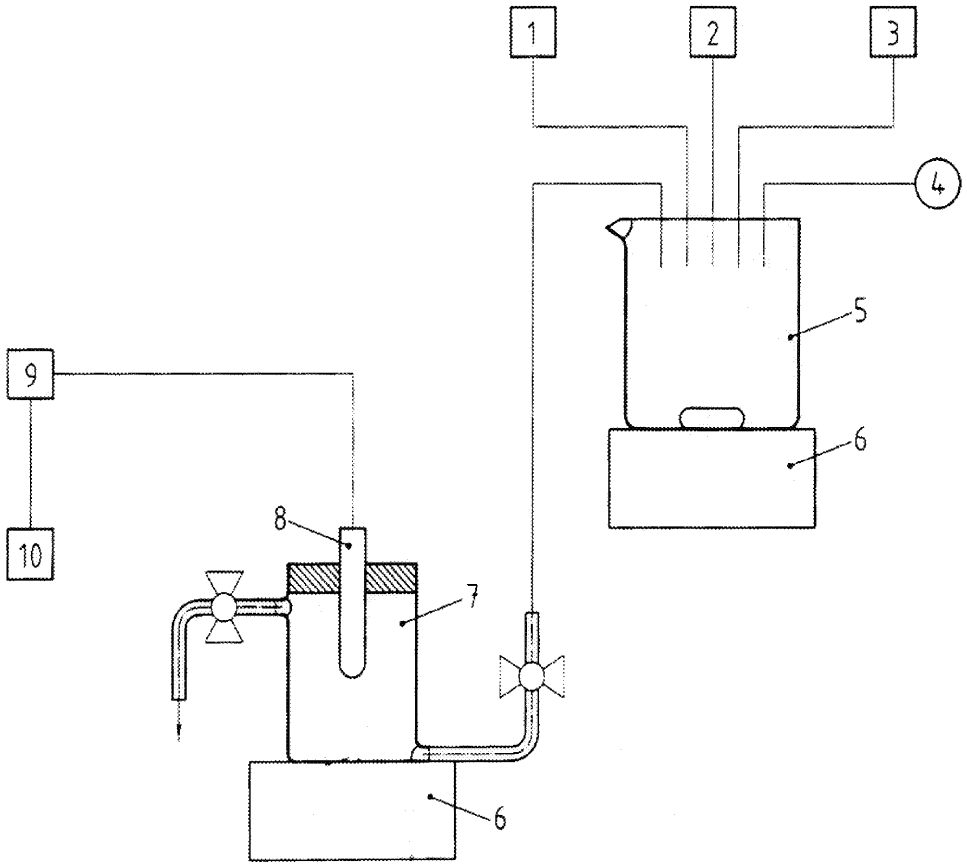
EC_x (účinná koncentrácia x %) je koncentrácia, ktorá v rámci stanoveného času expozície vyvolá účinok x % na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Napríklad EC_{50} je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že v stanovenom čase expozície vyvolá účinok na výsledok testu pri 50 % exponovanej populácie.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa nepozoruje žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného času expozície v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Dodatok 2

Obrázok 1: **Príklad meracej jednotky**

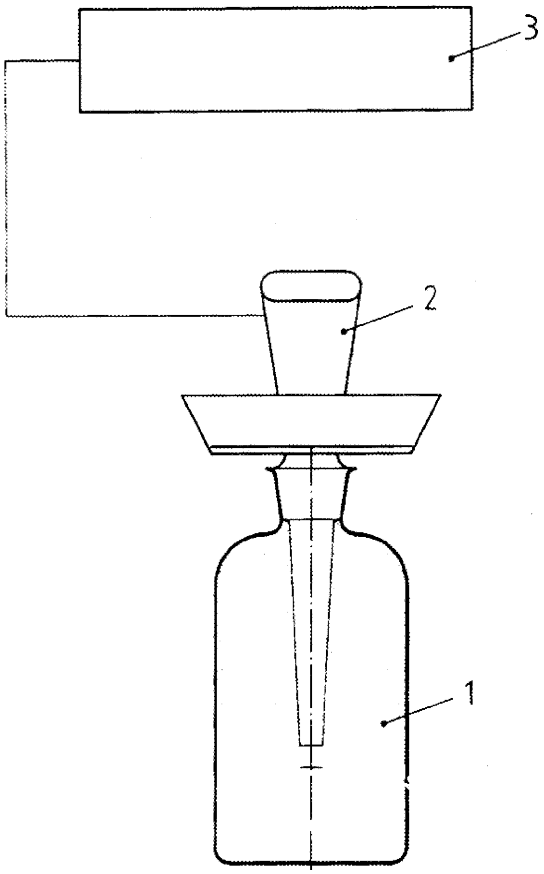


Legenda

1	aktivovaný kal	6	magnetické miešadlo
2	syntetické médium	7	komora na meranie koncentrácie kyslíka
3	testovaná chemikália	8	kyslíková elektróda
4	vzduch	9	prístroj na meranie koncentrácie kyslíka
5	zmiešavacia nádoba	10	registračný prístroj

Dodatok 3

Obrázok 2: **Príklad meracej jednotky s použitím BOD fľaše**



Legenda

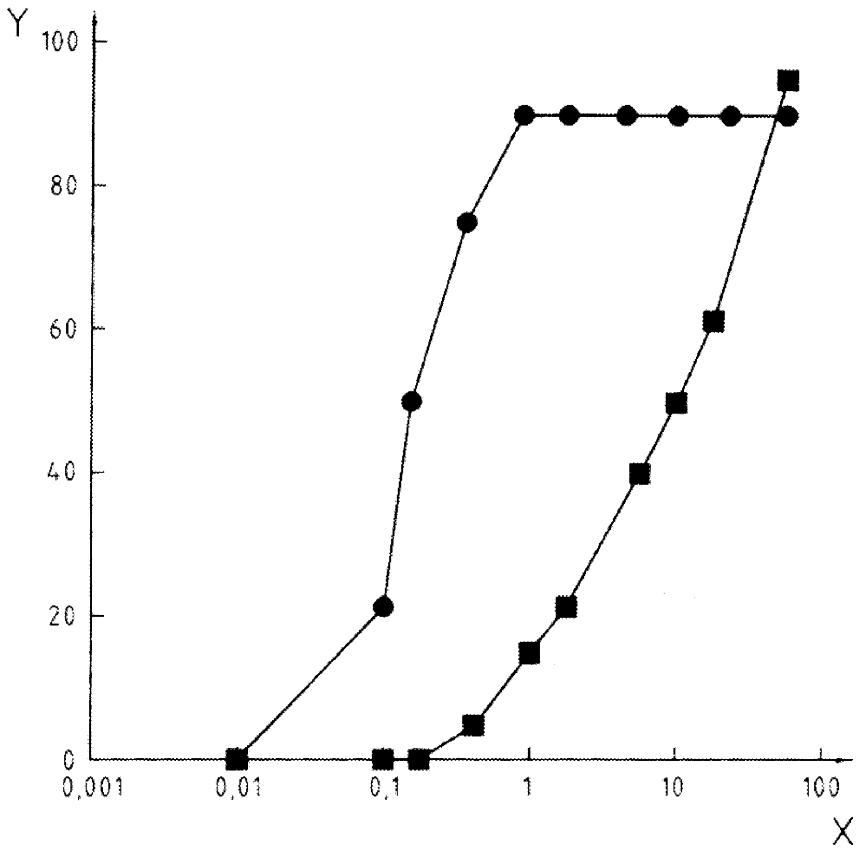
1 testovacia nádoba

2 kyslíková elektróda

3 prístroj na meranie koncentrácie kyslíka

Dodatok 4

Obrázok 3: **Príklad inhibičných kriviek**



Legenda

X koncentrácia 3,5-dichlórfenolu (mg/l)

Y inhibícia (%)

■ inhibícia heterotrofnej respirácie pomocou nitrifikačného kalu

● inhibícia nitrifikácie pomocou nitrifikačného kalu“

5. Kapitola C.26 sa nahrádza takto:

„C.26 **DRUHY RODU *LEMNA*, TEST INHIBÍCIE RASTU**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 221 (2006). Určená je na hodnotenie toxicity chemikálií pre sladkovodné rastliny rodu *Lemna* (žaburinka). Založená je na existujúcich metódach uvedených v literatúre pod číslami (1) (2) (3) (4) (5) (6), obsahuje však modifikácie týchto metód zohľadňujúce najnovší výskum a konzultácie týkajúce sa niekoľkých kľúčových aspektov. Táto testovacia metóda bola validovaná medzinárodnou porovnávacou skúškou (7).

2. Táto testovacia metóda opisuje testovanie toxicity pri použití druhov *Lemna gibba* a *Lemna minor*, ktoré sú podrobené rozsiahlym štúdiám a podliehajú uvedeným normám. Taxonómia rodu *Lemna* je zložitá, komplikuje ju výskyt veľkého množstva fenotypov. Aj keď sa v prípade rodu *Lemna* môže vyskytnúť genetická variabilita pri reakcii na toxické látky, v súčasnosti neexistujú dostatočné údaje o tomto zdroji variability tak, aby sa mohol odporučiť konkrétny klon na použitie v rámci tejto testovacej metódy. Je potrebné si uvedomiť, že test sa nevykonáva axenicky, ale jednotlivé kroky počas postupu testu sa vykonávajú v etapách, aby sa minimalizovala kontaminácia inými organizmami.

3. Uvádzajú sa informácie o testovaní pri obnove (semistatické a prietokové) a bez obnovy (statické) testovacieho roztoku. V závislosti od cieľov testu a od regulačných požiadaviek sa odporúča zvážiť použitie semistatických a prietokových metód, napríklad pre chemikálie, ktoré z roztoku rýchlo unikajú v dôsledku odparovania, fotodegradácie, precipitácie alebo biodegradácie. Ďalšie informácie sú uvedené v literatúre pod číslom (8).

4. Vymedzenie použitých pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

5. Umožní sa exponenciálny rast rastlinných kultúr rodu *Lemna* vo forme monokultúr v odlišných koncentráciách testovanej chemikálie počas siedmich dní. Cieľom testu je kvantifikovať účinky chemikálie na vegetatívny rast v uvedenom čase na základe hodnotenia zvolených meraných premenných. Najdôležitejšou meranou premennou je počet lístkov. Meria sa ešte aspoň jedna ďalšia premenná (celková plocha lístkov, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave), keďže niektoré chemikálie môžu oveľa viac ovplyvniť iné merané premenné ako počet lístkov. Na kvantifikovanie účinkov chemikálie sa rast v testovacích roztokoch porovnáva s rastom v kontrolných vzorkách a stanoví sa koncentrácia spôsobujúca špecifickú x % inhibíciu rastu (napr. 50 %) a vyjadrí sa ako EC_x (napr. EC_{50}).

6. Konečným bodom testu je inhibícia rastu vyjadrená ako logaritmický nárast meranej premennej (priemerná špecifická rýchlosť rastu) počas expozície. Z priemerných hodnôt špecifickej rýchlosti rastu zaznamenaných v sérii testovacích roztokov sa stanoví koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu rýchlosti rastu (napr. 50 %), a vyjadrí sa ako E_rC_x (napr. E_rC_{50}).

7. Ďalšou premennou hodnotou reakcie použitou v tejto testovacej metóde je výťažok, ktorý sa v niektorých krajinách môže vyžadovať na splnenie špecifických regulačných požiadaviek. Vymedzený je ako rozdiel hodnoty meraných premenných na konci expozície a hodnoty meraných premenných na jej začiatku. Z výťažku zaznamenaného v sérii testovacích roztokov sa vypočíta koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu výťažku (napr. 50 %), a vyjadrí sa ako E_yC_x (napr. E_yC_{50}).

8. Okrem toho je možné štatisticky stanoviť najnižšiu koncentráciu s pozorovaným účinkom (LOEC), ako aj koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

9. Na kvantifikáciu chemikálie v testovacom médiu by mala byť k dispozícii analytická metóda s vhodnou citlivosťou.

10. Informácie o testovanej chemikálii, ktoré môžu byť užitočné pri stanovovaní testovacích podmienok, zahŕňajú štrukturálny vzorec, čistotu, rozpustnosť vo vode, stabilitu vo vode a svetle, pK_a, K_{ow}, tlak pary a biodegradovateľnosť. Rozpustnosť vo vode a tlak pary je možné použiť na výpočet Henryho konštanty, ktorá bude indikovať, či môže dôjsť k značným úbytkom testovanej chemikálie počas testu. To pomôže pri indikácii, či je potrebné prijať konkrétne kroky na kontrolu takýchto úbytkov. Ak sú informácie o rozpustnosti a stabilite testovanej chemikálie neurčité, odporúča sa, aby sa tieto informácie hodnotili za podmienok testu, t. j. s rastovým médiom, teplotou, režimom osvetľovania používanými v teste.

11. Ak je kontrola pH testovacieho média obzvlášť dôležitá, napríklad pri testovaní kovov alebo chemikálií, ktoré sú hydrolyticky nestabilné, odporúča sa pridať do rastového média tlmivý roztok (pozri bod 21). Ďalšie informácie týkajúce sa testovaných chemikálií s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v literatúre pod číslom (8).

PLATNOSŤ TESTU

12. Tento test je platný, iba ak čas zdvojnásobenia počtu lístkov v kontrolnej vzorke je menej ako 2,5 dňa (60 hod.), čo zodpovedá približne sedemnásobnému zvýšeniu za sedem dní a priemernej špecifickej rýchlosti rastu 0,275 deň$^{-1}$. Pri použití média a za podmienok testu uvedených v tejto testovacej metóde sa toto kritérium môže splniť, ak sa použije statický test (5). Rovnako sa predpokladá, že toto kritérium bude možné dosiahnuť aj za podmienok semistatického a prietokového testu. Výpočet času zdvojenia je uvedený v bode 49.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

13. Referenčné chemikália, resp. chemikálie, ako napríklad 3,5-dichlórfenol, používané v medzinárodnej porovnávacej skúške (7) sa môžu testovať ako prostriedok kontroly postupu testu. Odporúča sa testovať referenčnú chemikáliu najmenej dvakrát do roka, alebo ak sa testovanie vykonáva zriedkavejšie, súbežne so stanovením toxicity testovanej chemikálie.

OPIS METÓDY

Zariadenie

14. Všetky zariadenia, ktoré prichádzajú do styku s testovacím médiom, by mali byť vyrobené zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu. Sklené nádoby používané na kultiváciu a na testovanie by sa mali vyčistiť od chemických kontaminantov, ktoré by sa mohli rozpúšťať v testovacom médiu, a mali by byť sterilné. Testovacie nádoby by mali byť dostatočne široké, aby lístky rôznych kolónií v kontrolných nádobách mohli rásť bez toho, aby sa na konci testu prekrývali. Neprekáža, ak sa korienky dotýkajú dna testovacích nádob, ale odporúča sa minimálna hĺbka 20 mm a minimálny objem 100 ml v každej testovacej nádobe. Výber testovacích nádob nie je rozhodujúci, pokiaľ sa tieto požiadavky dodržia. Vhodné sú všetky druhy sklených kadičiek, kryštalizačných misiek alebo sklených Petriho misiek primeraných rozmerov. Testovacie nádoby musia byť zakryté, aby sa minimalizovalo vyparovanie a náhodná kontaminácia, pričom sa musí umožniť potrebná výmena vzduchu. Vhodné testovacie nádoby, a predovšetkým veká, nesmú spôsobovať tienenie alebo zmeny spektrálnych charakteristík svetla.

15. Kultúry a testovacie nádoby by sa nemali uchovávať spoločne. To je možné najlepšie dosiahnuť použitím oddelených environmentálnych rastových komôr, inkubátorov alebo miestností. Osvetlenie a teplota musia byť nastavovateľné a udržiavané na konštantnej úrovni (pozri body 35 a 36).

Testované organizmy

16. Organizmus používaný pre tento test je buď *Lemna gibba*, alebo *Lemna minor*. Krátka charakteristika druhov žaburinky, ktoré sa používajú na testovanie toxicity, je uvedená v dodatku 2. Rastlinný materiál je možné získať zo zbierky kultúr, z iného laboratória alebo z terénu. Ak je získaný z terénu, je potrebné minimálne osem týždňov pred použitím uchovávať rastliny v kultúre v rovnakom médiu, aké sa používa na testovanie. Miesta v teréne použité na zbieranie počiatočných kultúr musia byť bez zrejmých zdrojov kontaminácie. Ak sa materiál získa z iného laboratória alebo zo zbierky kultúr, mal by sa takisto uchovávať minimálne tri týždne. Vždy je potrebné uviesť v správe zdroj rastlinného materiálu a druh a klon (ak je známy) použitý na testovanie.

17. Používať by sa mali monokultúry, ktoré sú viditeľne bez kontaminácie inými organizmami, ako sú napríklad riasy a prvoky. dravé rastliny *L. minor* sa skladajú z kolónií obsahujúcich dva až päť lístkov, kým zdravé kolónie *L. gibba* môžu obsahovať až sedem lístkov.

18. Kvalita a uniformita rastlín, ktoré sa používajú na test, budú mať značný vplyv na výsledok testu, a preto by sa mali starostlivo vyberať. Použiť by sa mali mladé, rýchlo rastúce rastliny bez viditeľných lézií alebo úbytku farby (chloróza). Kvalitné kultúry sa prejavujú vysokým výskytom kolónií, ktoré pozostávajú najmenej z dvoch lístkov. Veľký počet jediných lístkov značí environmentálny stres, napríklad obmedzený prísun živín, preto by sa rastlinný materiál z takýchto kultúr nemal použiť na testovanie.

Kultivácia

19. Na zníženie frekvencie uchovávania kultúr (napr. v čase, keď sa neplánujú žiadne testy s rodom *Lemna*) sa kultúry môžu uchovávať pri zníženom osvetlení a teplote (4 – 10 °C). Informácie o kultivovaní sú uvedené v dodatku 3. Zrejmé znaky kontaminácie riasami alebo inými organizmami si môžu vyžadovať povrchovú sterilizáciu čiastočnej vzorky lístkov rastlín rodu *Lemna*, ktorá sa potom prenesie do čerstvého média (pozri dodatok 3). V tomto prípade by sa zvyšná kontaminovaná kultúra mala vyradiť.

20. Najmenej sedem dní pred vykonaním testu sa dostatočný počet kolónií prenesie sterilne do čerstvého sterilného média a kultivuje 7 – 10 dní za podmienok testu.

Testovacie médium

21. Pre druhy *Lemna minor* a *Lemna gibba* sa odporúčajú rôzne médiá, ako je uvedené nižšie. Je potrebné starostlivo posúdiť pridanie pH tlmivého roztoku do testovacieho média [MOPS (kyselina 4-morfolinopropánsulfónová, číslo CAS: 1132–61–2) v médiu pre *L. minor* a $NaHCO_3$ v médiu pre *L. gibba*], ak sa očakáva, že by mohol reagovať s testovanou chemikáliou a ovplyvniť vyjadrenie jej toxicity. Steinbergovo médium (9) je tiež prijateľné, pokiaľ sú splnené kritériá platnosti.

22. Na kultiváciu a testovanie druhu *L. minor* sa odporúča modifikácia švédskej normy (SIS) rastového média pre rod *Lemna*. Zloženie tohto média je uvedené v dodatku 4.

23. Na kultiváciu a testovanie druhu *L. gibba* sa odporúča rastové médium 20X – AAP, ako je uvedené v dodatku 4.

24. Steinbergovo médium, ako je uvedené v dodatku 4, je takisto vhodné pre druh *L. minor*, no môže sa použiť aj pre druh *L. gibba*, pokiaľ sú splnené kritériá platnosti.

Testovacie roztoky

25. Testovacie roztoky sa pripravujú obvykle zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky testovanej chemikálie sa spravidla pripravujú rozpustením látky v rastovom médiu.

26. Najvyššia testovacia koncentrácia testovanej chemikálie by spravidla nemala byť vyššia ako rozpustnosť látky vo vode za podmienok testu. Je však potrebné si uvedomiť, že rastliny rodu *Lemna* plávajú na povrchu a môžu byť vystavené chemikáliám, ktoré sa zhromažďujú na rozhraní voda – vzduch (napr. látky, ktoré sú vo vode zle rozpustné, hydrofóbne látky alebo povrchovo aktívne látky). Za takýchto podmienok bude expozícia pochádzať z iného materiálu, než sa nachádza v roztoku, a testovacie koncentrácie môžu byť v závislosti od vlastností testovanej chemikálie vyššie ako rozpustnosť vo vode. Pre testované chemikálie s nízkou rozpustnosťou vo vode môže byť potrebné pripraviť koncentrovaný zásobný roztok alebo disperziu chemikálie s použitím organického rozpúšťadla alebo disperzantu, aby sa umožnilo pridanie presných množstiev testovanej chemikálie do testovacieho média a napomohlo jej rozptýlenie a rozpustenie. Treba vyvinúť maximálne úsilie na to, aby sa zabránilo použitiu takýchto materiálov. Nemala by sa vyskytovať žiadna fytotoxicita v dôsledku použitia pomocných rozpúšťadiel alebo disperzantov. Napríklad k bežne používaným rozpúšťadlám, ktoré nespôsobujú fytotoxicitu pri koncentráciách do 100 µl/l, patrí acetón a dimetylformamid. Ak sa používa rozpúšťadlo alebo disperzant, jeho konečná koncentrácia by sa mala zaznamenať a udržiavať na minime (≤ 100 µl/l) a všetky vzorky s aplikovanou chemikáliou a kontrolné vzorky by mali obsahovať rovnakú koncentráciu rozpúšťadla alebo disperzantu. Ďalšie informácie o použití disperzantov sú uvedené v literatúre pod číslom (8).

Testovacie a kontrolné skupiny

27. Predchádzajúce poznatky o toxicite testovanej chemikálie pre rod *Lemna*, napríklad z testov na vyhľadávanie rozsahu, pomôžu pri voľbe vhodných testovaných koncentrácií. V konečnom teste toxicity by spravidla malo byť najmenej päť testovaných koncentrácií zoradených v geometrických radoch. Rozdeľovacia konštanta medzi testovanými koncentráciami by prednostne nemala byť viac ako 3,2, no môže sa použiť aj vyššia hodnota, ak je krivka závislosti veličiny od koncentrácie plochá. Je potrebné uviesť zdôvodnenie, ak sa použije menej ako päť koncentrácií. Na každú testovanú koncentráciu by sa mali použiť najmenej tri replikáty.

28. Pri stanovení rozsahu testovaných koncentrácií (v prípade testu na vyhľadávanie rozsahu a/alebo konečného testu toxicity) je potrebné zvážiť tieto okolnosti:

— Na stanovenie koncentrácie EC_x musia testované koncentrácie podopierať hodnotu EC_x tak, aby sa zabezpečila primeraná úroveň spoľahlivosti. Napríklad ak sa odhaduje koncentrácia EC_{50}, najvyššia testovaná koncentrácia musí byť vyššia ako hodnota EC_{50}. Ak je hodnota EC_{50} mimo rozsahu testovaných koncentrácií, príslušné intervaly spoľahlivosti budú veľké a môže sa stať, že nebude možné správne posúdiť vhodnosť modelu pre štatistické spracovanie.

— Ak je cieľom odhad koncentrácií LOEC/NOEC, najnižšia testovaná koncentrácia by mala byť dostatočne nízka na to, aby rast nebol významne nižší než v kontrolnej vzorke. Okrem toho najvyššia testovaná koncentrácia by mala byť dostatočne vysoká na to, aby bol rast významne nižší než v kontrolnej vzorke. Ak to tak nie je, test sa bude musieť opakovať s použitím iného koncentračného rozsahu (pokiaľ najvyššia koncentrácia nie je medzou rozpustnosti alebo najvyššou povolenou limitnou hodnotou koncentrácie, napríklad 100 mg/l).

29. Každý test by mal zahŕňať kontrolné vzorky pozostávajúce z rovnakého média obsahujúceho živiny, počtu lístkov a kolónií, environmentálnych podmienok a postupov ako v prípade testovacích nádob, ale bez testovanej chemikálie. Ak sa používa pomocné rozpúšťadlo alebo disperzant, musí sa zahrnúť ďalšia kontrola s rozpúšťadlom/disperzantom v rovnakej koncentrácii, aká sa nachádza v nádobách s testovanou chemikáliou. Počet paralelných kontrolných nádob (a v prípade potreby nádob s rozpúšťadlom) by mal byť minimálne rovnaký alebo v ideálnom prípade dvojnásobný ako počet nádob použitý pre každú testovanú koncentráciu.

30. Ak sa nevyžaduje stanovenie koncentrácie NOEC, môže sa test pozmeniť: zvýšiť počet koncentrácií a znížiť počet replikátov na koncentráciu. Musia však existovať minimálne tri kontrolné replikáty.

Expozícia

31. Kolónie pozostávajúce z 2 až 4 viditeľných lístkov sa prenesú do kultúry inokula a náhodne sa rozdelia do testovacích nádob za sterilných podmienok. Každá testovacia nádoba by mala obsahovať celkove 9 až 12 lístkov. Počet lístkov a kolónií by mal byť rovnaký v každej testovacej nádobe. Zo skúseností pri použití tejto metódy a údajov z medzilaboratórneho porovnania vyplýva, že na detekciu rozdielov v raste približne v rozsahu 4 – 7 % inhibície vypočítanej na základe rýchlosti rastu (10 – 15 % vypočítanej podľa výťažku) medzi aplikáciami chemikálie stačia tri replikáty na jednu aplikáciu chemikálie, pričom každý replikát obsahuje na začiatku 9 až 12 lístkov (7).

32. Je potrebné, aby sa testovacie nádoby v inkubátore umiestňovali náhodne, čím sa minimalizuje vplyv priestorových rozdielov v intenzite svetla alebo teplote. Takisto je potrebné blokové usporiadanie alebo náhodné premiestňovanie nádob pri vykonávaní pozorovaní (alebo častejšie premiestňovanie).

33. Ak z predbežnej skúšky stability vyplýva, že nie je možné zachovať koncentráciu testovanej chemikálie (t. j. meraná koncentrácia klesne pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie) počas trvania testu (7 dní), odporúča sa vykonať semistatický test. V tom prípade by mali byť kolónie vystavené čerstvo pripraveným testovacím a kontrolným roztokom najmenej dvakrát počas testu (napr. na 3. a 5. deň). Frekvencia expozície čerstvému médiu bude závisieť od stability testovanej chemikálie. Môže byť potrebná vyššia frekvencia na zachovanie približne konštantných koncentrácií veľmi nestabilných alebo prchavých látok. V niektorých prípadoch môže byť potrebné použiť prietokový postup (8) (10).

34. Expozičný scenár aplikácie na listy (sprejom) sa v tejto testovacej metóde nenachádza, preto pozri odkaz v literatúre pod číslom (11).

Podmienky inkubácie

35. Použije sa kontinuálne teplé alebo studené biele fluorescenčné osvetlenie na zabezpečenie zvolenej intenzity svetla v rozsahu 85 – 135 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ pri meraní vo fotosynteticky aktívnom žiarení (400 – 700 nm) v bodoch, ktoré sú v rovnakej vzdialenosti od zdroja svetla ako lístky rastliny rodu *Lemna* (v rozsahu od 6 500 do 10 000 lux). Žiadna odchýlka od zvolenej intenzity svetla nad plochou, kde sa uskutočňuje test, nesmie presiahnuť hodnotu ± 15 %. Metóda detekcie a merania svetla, najmä typ senzora, ovplyvní meranú hodnotu. Guľové senzory (ktoré reagujú na svetlo zo všetkých uhlov nad a pod rovinou merania) a ‚kosínusové' senzory (ktoré reagujú na svetlo zo všetkých uhlov nad rovinou merania) sa uprednostňujú pred jednosmernými senzormi a poskytujú presnejšie snímanie v prípade viacbodového svetelného zdroja takého typu, aký sa uvádza v tejto metóde.

36. Teplota v testovacích nádobách by mala byť 24 °C ± 2 °C. Hodnota pH kontrolného média by sa nemala zvýšiť počas testu o viac ako 1,5 jednotky. Odchýlka o viac ako 1,5 jednotky by však nespôsobila neplatnosť testu, ak sa preukáže, že sú splnené kritériá platnosti. V určitých prípadoch je potrebné venovať zvýšenú pozornosť kolísaniu pH napr. pri testovaní nestabilných chemikálií alebo kovov. Ďalšie informácie sú uvedené v literatúre pod číslom (8).

Trvanie

37. Test sa ukončí 7 dní po premiestnení rastlín do testovacích nádob.

Merania a analytické stanovenia

38. Na začiatku testu sa spočíta a zaznamená počet lístkov v testovacích nádobách, pričom je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa spočítali vystupujúce, zreteľne viditeľné lístky. Počet lístkov, ktoré majú normálny alebo abnormálny vzhľad, je potrebné stanoviť na začiatku testu, minimálne každé 3 dni počas expozície (t. j. najmenej dvakrát počas 7 dní) a po ukončení testu. Je potrebné si všimnúť zmeny vo vývoji rastliny, napríklad vo veľkosti lístkov, vzhľade, známky nekrózy, chlorózy alebo gibozity, rozpad kolónií alebo stratu schopnosti plávať na hladine či v dĺžke a vzhľade korienkov. Je potrebné si všimnúť aj významné znaky testovacieho média (napr. prítomnosť nerozpusteného materiálu, rast rias v testovacej nádobe).

39. Okrem stanovenia počtu lístkov počas testu sa posudzujú aj účinky testovanej chemikálie na jednu (alebo viac) z týchto meraných premenných:

    i) celková plocha lístkov;

    ii) sušina;

    iii) hmotnosť v čerstvom stave.

40. Celková plocha lístkov je výhodná, pretože sa dá stanoviť pre každý test a kontrolnú nádobu na začiatku, počas a na konci testu. Sušinu alebo hmotnosť v čerstvom stave je potrebné stanoviť na začiatku testu zo vzorky kultúry inokula, ktorá predstavuje kultúru použitú na začiatku testu a na konci testu, s rastlinným materiálom z každého testu a kontrolnej nádoby. Ak sa plocha lístkov nemeria, uprednostňuje sa sušina pred hmotnosťou v čerstvom stave.

41. Celková listová plocha, sušina a hmotnosť v čerstvom stave sa môžu stanoviť takto:

    i) *celková listová plocha:* celková listová plocha všetkých kolónií sa môže stanoviť obrazovou analýzou. Siluetu testovacej nádoby a rastlín je možné zachytiť prostredníctvom videokamery (t. j. umiestnením nádoby na svetelný box) a výsledný obraz sa digitalizuje. Kalibráciou plochých tvarov známej plochy sa potom môže stanoviť celková listová plocha v testovacej nádobe. Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa vylúčila interferencia spôsobená okrajom testovacej nádoby. Alternatívnym, ale prácnejším prístupom je urobiť fotokópiu testovacej nádoby a rastlín, vystrihnúť výslednú siluetu kolónií a stanoviť ich plochu s použitím analyzátora plochy lístkov alebo milimetrového papiera. Vhodné môžu byť aj iné techniky (napr. pomer hmotnosti papiera medzi plochou siluety kolónii a jednotkou plochy).

    ii) *sušina:* všetky kolónie sa zozbierajú z každej testovacej nádoby a opláchnu sa destilovanou alebo deionizovanou vodou. Osušia sa, aby sa odstránila nadbytočná voda, a potom sa sušia pri 60 °C na konštantnú hmotnosť. Musia obsahovať všetky úlomky korienkov. Sušina sa musí vyjadriť s presnosťou minimálne 0,1 mg.

    iii) *hmotnosť v čerstvom stave:* všetky kolónie sa prenesú do predvážených polystyrénových skúmaviek (alebo z iného inertného materiálu) s malými (1 mm) otvormi v zaoblených dnách. Skúmavky sa potom 10 minút centrifugujú pri rýchlosti 3 000 ot/min a pri izbovej teplote. Skúmavky obsahujúce už vysušené kolónie sa opätovne prevážia a hmotnosť v čerstvom stave sa vypočíta odpočítaním hmotnosti prázdnej skúmavky.

Frekvencia meraní a analytické stanovenia

42. Ak sa použije statický test, na začiatku a na konci testu by sa mala zmerať hodnota pH každej vzorky s aplikovanou chemikáliou. Ak sa použije semistatický test, hodnota pH by sa mala zmerať v každej dávke ‚čerstvého' testovacieho roztoku pred každým obnovením a aj v zodpovedajúcich ‚spotrebovaných' roztokoch.

43. Svietivosť by sa mala merať v rastovej komore, inkubátore alebo miestnosti v bodoch v rovnakej vzdialenosti od zdroja svetla ako lístky rastliny rodu *Lemna*. Merania by sa mali vykonať minimálne jedenkrát počas testu. Teplota média v náhradnej nádobe udržiavanej v rovnakých podmienkach v rastovej komore, inkubátore alebo miestnosti by sa mala zaznamenať minimálne jedenkrát za deň.

44. Počas testu sa v príslušných intervaloch stanovia koncentrácie testovanej látky. V rámci statických testov je potrebné stanoviť koncentrácie minimálne na začiatku a na konci testu.

45. V rámci semistatických testov, kde sa očakáva, že hodnoty koncentrácie testovanej chemikálie nebudú v rozsahu ± 20 % nominálnej koncentrácie, je potrebné analyzovať všetky čerstvo pripravené testovacie roztoky a rovnaké roztoky pri každom obnovení (pozri bod 33). V prípade testov, kde nameraná hodnota počiatočnej koncentrácie testovanej chemikálie neleží v rozsahu ± 20 % nominálnej hodnoty, ale kde je možné poskytnúť dostačujúce dôkazy na preukázanie, že počiatočné koncentrácie sú opakovateľné a stabilné (t. j. v rozsahu od 80 do 120 % počiatočnej koncentrácie), sa však chemické stanovenia môžu vykonať iba s najvyššími a najnižšími testovanými koncentráciami. Vo všetkých prípadoch je potrebné stanoviť koncentrácie testovanej chemikálie pred obnovením iba v jednej paralelnej nádobe na každú testovaciu koncentráciu (alebo obsahy nádob rozdelených do replikátov).

46. Ak sa použije prietokový test, je vhodný podobný systém odberu vzoriek, ako je uvedený pre semistatické testy, vrátane analýzy na začiatku, v polovici a na konci testu, pričom meranie ‚spotrebovaných' roztokov v tomto prípade nie je vhodné. Pri tomto type testu sa musí denne kontrolovať prietoková rýchlosť riedidla a testovanej chemikálie alebo zásobného roztoku testovanej chemikálie.

47. Ak je dokázané, že koncentrácia chemikálie, ktorá sa testuje, je počas testu v dostatočnej miere udržiavaná v rozsahu ± 20 % nominálnej hodnoty alebo nameranej počiatočnej koncentrácie, analýza výsledkov sa môže zakladať na nominálnych alebo nameraných počiatočných hodnotách. Ak je odchýlka od nominálnej alebo nameranej počiatočnej koncentrácie väčšia ako ± 20 %, analýza výsledkov by sa mala zakladať na geometrickej strednej koncentrácii počas expozície alebo na modeloch opisujúcich pokles koncentrácie testovanej chemikálie (8).

Limitný test

48. V určitých situáciách, napríklad keď z predbežného testu vyplýva, že testovaná chemikália nemá žiadne toxické účinky pri koncentráciách do 100 mg/l alebo do jej limitu rozpustnosti v testovacom médiu (podľa toho, ktorá hodnota je nižšia), sa môže vykonať limitný test umožňujúci porovnanie reakcií v kontrolnej skupine a jednej skupine s aplikovanou chemikáliou (100 mg/l alebo koncentrácia rovná limitu rozpustnosti). Dôrazne sa odporúča, aby sa táto skutočnosť zakladala na analýze expozičnej koncentrácie. Na limitný test sa vzťahujú všetky už uvedené testovacie podmienky a kritériá platnosti s výnimkou, že počet replikátov s aplikovanou chemikáliou by mal byť dvojnásobný. Rast v kontrolnej skupine a skupine s aplikovanou chemikáliou sa môže analyzovať použitím štatistického testu na porovnanie stredných hodnôt napr. Studentovho t-testu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Čas zdvojnásobenia

49. Na stanovenie času zdvojnásobenia (T_d) počtu lístkov a pri dodržaní tohto kritéria platnosti podľa štúdie (bod 12) sa použije tento vzorec s údajmi, ktoré sa získali z kontrolných nádob:

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

kde μ je priemerná špecifická rýchlosť rastu stanovená postupom opísaným v bodoch 54 a 55.

Premenné hodnoty reakcie

50. Účelom testu je stanoviť účinky testovanej chemikálie na vegetatívny rast rastlín rodu *Lemna*. Táto testovacia metóda opisuje dve závisle premenné veličiny reakcie, keďže rôzne jurisdikcie majú rozdielne preferencie a regulačné požiadavky. Na to, aby boli výsledky testu prijateľné vo všetkých jurisdikciách, by sa účinky mali hodnotiť s použitím obidvoch uvedených závisle premenných reakcie a) a b).

a) *Priemerná špecifická rýchlosť rastu:* táto závisle premenná veličina reakcie sa vypočíta na základe zmien logaritmu počtu lístkov a navyše na základe zmien logaritmu iného parametra merania (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) v čase (vyjadrené za deň) v kontrolných skupinách a v každej skupine s aplikovanou chemikáliou. Niekedy sa uvádza ako relatívna rýchlosť rastu (12).

b) *Výťažok:* táto závisle premenná veličina reakcie sa vypočíta na základe zmien počtu lístkov a navyše na základe zmien iného parametra merania (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) v kontrolných skupinách a v každej skupine s aplikovanou chemikáliou až do ukončenia testu.

51. Je potrebné si uvedomiť, že hodnoty toxicity vypočítané použitím týchto dvoch závisle premenných veličín reakcie nie sú porovnateľné a tento rozdiel sa musí zohľadniť pri použití výsledkov testu. Pri dodržaní testovacích podmienok tejto testovacej metódy budú hodnoty EC_x založené na priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) spravidla vyššie ako výsledky založené na výťažku (E_yC_x), a to v dôsledku matematického základu príslušných postupov. Nemalo by sa to vysvetľovať ako rozdiel v citlivosti medzi obidvoma závisle premennými veličinami reakcie, ale len tak, že sa hodnoty odlišujú matematicky. Koncepcia priemernej špecifickej rýchlosti rastu sa zakladá na všeobecnom exponenciálnom modeli rastu žaburiniek v nelimitovaných kultúrach, kde sa toxicita stanovuje na základe účinkov na rýchlosť rastu, bez závislosti od absolútnej úrovne špecifickej rýchlosti rastu kontrolnej kultúry, od sklonu krivky závislosti veličiny koncentrácie alebo od dĺžky testu. Naopak je to v prípade výsledkov založených na závisle premennej veličine výťažku, ktoré sú závislé od všetkých ďalších premenných. Hodnota E_yC_x je závislá od špecifickej rýchlosti rastu žaburiniek, ktoré sa používajú v každom teste, a od maximálnej špecifickej rýchlosti rastu, ktorá sa môže meniť medzi druhmi a dokonca aj medzi odlišnými klonmi. Táto závisle premenná veličina by sa nemala používať na porovnávanie citlivosti na toxické látky medzi druhmi žaburinky alebo dokonca medzi odlišnými klonmi. Zatiaľ čo z vedeckého hľadiska sa na odhady toxicity uprednostňuje použitie priemernej špecifickej rýchlosti rastu, do tejto testovacej metódy bolo zahrnuté aj stanovenie toxicity na základe výťažku, aby sa tak vyhovelo regulačným požiadavkám platným v rámci niektorých jurisdikcií.

52. Odhady toxicity by sa mali zakladať na počte lístkov a na jednej ďalšej meranej premennej (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave), keďže niektoré chemikálie môžu oveľa viac ovplyvniť iné merané premenné ako počet lístkov. Tento účinok by sa nemal stanovovať iba na základe počítania počtu lístkov.

53. Počet lístkov, ako aj každá iná zaznamenaná meraná premenná, t. j. celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave, sa pri každom meraní zapíše do tabuľky spolu s koncentráciami testovanej chemikálie. Následná analýza údajov, napríklad odhad koncentrácií LOEC, NOEC alebo EC_x, by sa mala zakladať na hodnotách pre jednotlivé replikáty a nie na vypočítaných stredných hodnotách pre každú skupinu s aplikovanou chemikáliou.

Priemerná špecifická rýchlosť rastu

54. Priemerná špecifická rýchlosť rastu za konkrétny čas sa vypočíta ako logaritmus nárastu premenných rastu – počtu lístkov a jednej ďalšej meranej premennej (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) – použitím uvedeného vzorca pre každý replikát kontrolných vzoriek a vzoriek s aplikovanou chemikáliou:

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

kde:

— μ_{i-j}: priemerná špecifická rýchlosť rastu od času i do j,

— N_i: meraná premenná v testovacej alebo kontrolnej nádobe v čase i,

— N_j: meraná premenná v testovacej alebo kontrolnej nádobe v čase j,

— t: čas medzi i a j.

Pre každú skupinu s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú skupinu sa vypočíta stredná hodnota rýchlosti rastu spolu s odhadmi rozptylu.

55. Priemerná špecifická rýchlosť rastu by sa mala vypočítať pre celý čas testu (čas ‚i' v uvedenom vzorci je začiatok testu a čas ‚j' je koniec testu). Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vypočíta stredná hodnota priemernej špecifickej rýchlosti rastu spolu s odhadmi rozptylu. Okrem toho by sa mala posúdiť fázová rýchlosť rastu, aby sa vyhodnotili účinky testovanej chemikálie, ktoré sa vyskytnú počas expozície (napr. skontrolovaním logaritmicky transformovaných rastových kriviek). Zo značných rozdielov medzi fázovou rýchlosťou rastu a priemernou rýchlosťou rastu vyplýva odchýlka od konštantného exponenciálneho rastu, ako aj skutočnosť, že bolo zaručené dôkladné preskúmanie rastových kriviek. V tomto prípade by bolo konzervatívnym prístupom porovnávanie špecifických rýchlostí rastu kultúr s aplikovanou chemikáliou počas maximálnej inhibície so špecifickými rýchlosťami rastu kontrolných kultúr v tom istom čase.

56. Percentuálna inhibícia rýchlosti rastu (I_r) sa môže potom vypočítať pre každú testovaciu koncentráciu (skupinu s aplikovanou chemikáliou) podľa tohto vzorca:

$$\% I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

kde:

— % I_r: percentuálna inhibícia priemernej špecifickej rýchlosti rastu,

— μ_C: stredná hodnota μ v kontrolnej skupine,

— μ_T: stredná hodnota pre μ v skupine s aplikovanou chemikáliou.

Výťažok

57. Účinky na výťažok sa stanovia na základe dvoch meraných premenných, počtu lístkov a jednej ďalšej meranej premennej (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) nachádzajúcej sa v každej testovacej nádobe na začiatku a na konci testu. Pre sušinu alebo hmotnosť v čerstvom stave sa počiatočné množstvo biomasy stanoví na základe vzorky lístkov odobratých z rovnakej dávky použitej na inokuláciu testovacích nádob (pozri bod 20). Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vypočíta stredná hodnota výťažku spolu s odhadmi rozptylu. Percentuálna inhibícia výťažku (% I_y) sa môže vypočítať pre každý replikát s aplikovanou chemikáliou takto:

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

kde:

— % I_y: percentuálna hodnota zníženia výťažku,

— b_C: rozdiel konečného množstva biomasy a počiatočného množstva biomasy pre kontrolnú skupinu,

— b_T: rozdiel konečného množstva biomasy a počiatočného množstva biomasy v skupine s aplikovanou chemikáliou.

Zostrojenie kriviek závislosti veličiny od koncentrácie

58. Je potrebné zostrojiť krivky závislosti veličiny od koncentrácie vzťahujúce sa na strednú hodnotu percentuálnej inhibície závisle premennej veličiny reakcie (I_r alebo I_y vypočítané podľa bodov 56 alebo 57), ako aj logaritmus koncentrácie testovanej chemikálie.

Odhad koncentrácie EC_x

59. Odhady koncentrácie EC_x (napr. EC_{50}) by sa mali zakladať na priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) a na výťažku (E_yC_x), pričom každý z týchto parametrov sa musí zasa zakladať na počte lístkov a jednej ďalšej meranej premennej (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave). Dôvodom je, že existujú testované chemikálie, ktoré rozdielne vplývajú na počet lístkov a na iné merané premenné. Požadovanými parametrami toxicity sú preto štyri hodnoty koncentrácie EC_x pre každú vypočítanú úroveň inhibície x: E_rC_x (počet lístkov), E_rC_x (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave), E_yC_x (počet lístkov), a E_yC_x (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave).

Štatistické postupy

60. Cieľom je získať kvantitatívny vzťah medzi koncentráciou a reakciou pomocou regresnej analýzy. Je možné použiť váženú lineárnu regresiu po vykonaní linearizovanej transformácie reakčných údajov – napríklad na probitové alebo logitové, prípadne Weibullove jednotky (13), ale uprednostňujú sa techniky nelineárnej regresie, ktorými sa lepšie spracujú nevyhnutné nepresnosti údajov a odchýlky od hladkých rozdelení. Priblížením buď k nulovej, alebo k úplnej inhibícii sa takéto nepresnosti môžu transformáciou zväčšiť a ovplyvniť analýzu (13). Je potrebné si uvedomiť, že štandardné metódy analýzy s použitím probitovej, logitovej alebo Weibullovej transformácie sú určené na použitie na kvantálne údaje (napr. o mortalite alebo prežití) a musia sa modifikovať, aby sa prispôsobili údajom o rýchlosti rastu alebo výťažku. Osobitné postupy na stanovenie hodnôt EC_x z kontinuálnych údajov je možné nájsť v literatúre pod číslami (14) (15) a (16).

61. Pre každú závisle premennú veličinu reakcie, ktorá sa má analyzovať, sa na výpočet bodových odhadov hodnôt ECx použije vzťah medzi koncentráciou a reakciou. Ak je to možné, je potrebné stanoviť 95 % hranice spoľahlivosti pre každý odhad. Vhodnosť reakčných údajov pre regresný model je potrebné vyhodnotiť buď graficky, alebo štatisticky. Regresná analýza sa musí vykonať s použitím reakcií jednotlivých replikátov, nie stredných hodnôt skupiny s aplikovanou chemikáliou.

62. Odhady hodnôt EC_{50} a hranice spoľahlivosti sa môžu získať aj použitím lineárnej interpolácie metódou ‚bootstrap' (17), ak sú dostupné regresné modely/metódy nevhodné pre dané údaje.

63. Pre odhad koncentrácií LOEC aj NOEC je potrebné porovnať stredné hodnoty skupiny s aplikovanou chemikáliou pomocou techník pre analýzu rozptylu (ANOVA). Stredná hodnota pre každú koncentráciu sa musí potom porovnať s kontrolnou strednou hodnotou s použitím príslušného viacnásobného porovnania alebo testovacej metódy trendu. Môže sa použiť Dunnettov alebo Williamsov test (18) (19) (20) (21). Je potrebné posúdiť, či je dodržaný predpoklad homogenity rozptylu ANOVA. Toto posúdenie sa môže vykonať graficky alebo formálnym testom (22). Vhodný je Levenov alebo Bartlettov test. Nesplnenie predpokladu homogenity rozptylov je niekedy možné korigovať logaritmickou transformáciou údajov. Ak je heterogenita rozptylu extrémna a nie je možné ju korigovať transformáciou, je potrebné posúdiť analýzu metódami, ako sú napríklad ‚step-down Jonkheere' testy trendu. Ďalšie informácie o stanovení hodnoty NOEC je možné nájsť v literatúre pod číslom (16).

64. Najnovší vývoj vo vede vedie k odporúčaniu upustiť od koncepcie NOEC a nahradiť ju regresiou založenou na bodovom odhade ECx. Príslušná hodnota x pre tento test na rastlinách rodu *Lemna* nebola stanovená. Vhodný sa však zdá byť rozsah 10 – 20 % (v závislosti od zvolenej závisle premennej veličiny reakcie), pričom prednostne by sa mali uvádzať hodnoty EC_{10} a EC_{20}.

Predkladanie správ

65. Skúšobný protokol musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti vrátane limitu rozpustnosti vo vode,

— identifikačné údaje chemikálie (napr. číslo CAS) vrátane čistoty (nečistôt).

Testovacie druhy:

— vedecký názov, klon (ak je známy) a zdroj.

Podmienky testu:

— použitý postup testovania (statický, semistatický alebo prietokový),

— dátum začiatku testu a jeho dĺžka,

— testovacie médium,

— opis priebehu experimentu: testovacie nádoby a veká, objemy roztokov, počet kolónií a lístkov na testovaciu nádobu na začiatku testu,

— testovacie koncentrácie (nominálne a merané podľa potreby) a počet replikátov na koncentráciu,

— metódy prípravy zásobných a testovacích roztokov vrátane použitia všetkých rozpúšťadiel alebo disperzantov,

— teplota počas testu,

— zdroj svetla, svietivosť a homogenita svetla,

— hodnoty pH testovacieho a kontrolného média,

— koncentrácie testovaných chemikálií a metóda analýzy s príslušným posúdením kvality údajov (validačné štúdie, štandardné odchýlky alebo hranice spoľahlivosti analýzy),

— metódy stanovenia počtu lístkov a iných meraných premenných, napríklad sušiny, hmotnosti v čerstvom stave alebo listovej plochy,

— všetky odchýlky od tejto testovacej metódy,

Výsledky:

— nespracované údaje: počet lístkov a iné merané premenné v každej testovacej a kontrolnej nádobe pri každom pozorovaní a analýze,

— stredné hodnoty a štandardné odchýlky pre každú meranú premennú,

— rastové krivky pre každú koncentráciu (odporúčané s logaritmicky transformovanou meranou premennou, pozri bod 55),

— čas zdvojnásobenia/rýchlosť rastu v kontrolných vzorkách na základe počtu lístkov,

— vypočítané hodnoty závisle premenných veličín reakcie pre každý replikát s aplikovanou chemikáliou, so strednými hodnotami a variačným koeficientom pre replikáty,

— grafické znázornenie vzťahu koncentrácie a účinku,

— odhady toxicity pre závisle premenné veličiny reakcie napr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a príslušné intervaly spoľahlivosti; ak sa vypočítavajú, hodnoty LOEC a/alebo NOEC a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— ak sa používa technika ANOVA, veľkosť účinku, ktorý je možné detegovať (napr. najmenej významný rozdiel),

— každá stimulácia rastu zistená v ľubovoľnej vzorke s aplikovanou chemikáliou,

— všetky viditeľné znaky fytotoxicity, ako aj pozorovania testovacích roztokov,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

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

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

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

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

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

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

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

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

9. International Organisation for Standardisation. ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

10. Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dodatok 1

Vymedzenia pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto pojmy a skratky:

Biomasa je sušina živej hmoty nachádzajúcej sa v populácii. V tomto teste biomasu nahrádza napríklad počet lístkov alebo plocha lístkov, ktoré sa bežne merajú, a používanie pojmu ‚biomasa' sa teda vzťahuje aj na tieto náhradné kritériá.

Chemikália je látka alebo zmes.

Chloróza je žltnutie tkaniva lístkov.

Klon je organizmus alebo bunka, ktorá vznikla z jedného jedinca nepohlavným rozmnožovaním. Jedince z rovnakého klonu sú preto geneticky identické.

Kolónia znamená zhluk navzájom spojených materských a dcérskych lístkov (obvykle 2 až 4). Niekedy sa uvádza ako rastlina.

EC_x je koncentrácia testovanej chemikálie rozpustenej v testovacom médiu, ktorej dôsledkom je x % (napr. 50 %) zníženie rastu rastlín rodu *Lemna* v rámci stanoveného času expozície (je potrebné výslovne uviesť, ak sa odchyľuje od celkovej alebo obvyklej dĺžky testu). Na jednoznačné označenie hodnoty EC odvodenej z rýchlosti rastu alebo výťažku sa používa symbol ‚E_rC' pre rýchlosť rastu a symbol ‚E_yC' pre výťažok, potom nasleduje použitá meraná premenná napr. ‚E_rC' (počet lístkov).

Prietokový test je test, v ktorom sa testovacie roztoky kontinuálne nahrádzajú.

Lístok je individuálna/samostatná ‚lístkovitá' štruktúra žaburinky. Je to najmenšia jednotka, resp. jedinec schopný rozmnožovania.

Gibozita je stav, keď lístky rastliny majú vypuklý alebo napuchnutý vzhľad.

Rast je nárast meranej premennej, napríklad počtu lístkov, sušiny, hmotnosti vo vlhkom stave alebo plochy lístkov, počas testu.

Rýchlosť rastu (priemerná špecifická rýchlosť rastu) je logaritmickým nárastom množstva biomasy počas expozície.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovacia koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje, že chemikália má štatisticky významný účinok na zníženie rastu (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou kultúrou v rámci daného času expozície. Škodlivý účinok všetkých testovacích koncentrácií nad LOEC však musí byť vždy rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila koncentrácia LOEC (a teda aj koncentrácia NOEC).

Merané premenné sú všetky typy premenných, ktoré sa merajú na vyjadrenie konečného parametra testu použitím jednej alebo viacerých závisle premenných veličín reakcie. V rámci tejto metódy sú meranými premennými počet lístkov, listová plocha, hmotnosť v čerstvom stave a sušina.

Monokultúra je kultúra s jedným druhom rastliny.

Nekróza je odumreté (t. j. biele alebo rozmočené) tkanivo lístkov.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovacia koncentrácia bezprostredne pod koncentráciou LOEC.

Fenotyp je viditeľná charakteristika organizmu určená interakciou jeho génov s jeho prostredím.

Závisle premenná veličina reakcie je premenná na odhad toxicity odvodená zo všetkých meraných premenných opisujúcich biomasu rôznymi metódami výpočtu. V prípade tejto testovacej metódy sú závislými premennými rýchlosti rastu a výťažok, ktoré sú odvodené od meraných premenných, ako je počet lístkov, listová plocha, hmotnosť v čerstvom stave alebo sušina.

Semistatický (obnovovací) test je test, v ktorom sa testovací roztok počas testu pravidelne nahrádza v stanovených intervaloch.

Statický test je testovacia metóda bez obnovy testovacieho roztoku počas testu.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Konečný parameter testu znamená všeobecný faktor, ktorý sa testovanou chemikáliou v porovnaní s kontrolnou vzorkou zmení ako cieľ testu. V prípade tejto testovacej metódy je konečným parametrom inhibícia rastu, ktorá sa dá vyjadriť rôznymi závisle premennými veličinami reakcie založenými na jednej alebo viacerých meraných premenných.

Testovacie médium je kompletné syntetické rastové médium, v ktorom rastú testovacie rastliny vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie. Testovaná chemikália sa spravidla rozpustí v testovacom médiu.

Výťažok je rozdiel hodnoty meranej premennej, ktorá vyjadruje množstvo biomasy, na konci expozície a hodnoty meranej premennej na jej začiatku.

Dodatok 2

Opis rodu *Lemna*

Vodná rastlina bežne nazývaná žaburinka (*Lemna* spp.) patrí do čeľade *Lemnaceae,* ktorá má množstvo druhov rozšírených po celom svete v štyroch rodoch. Ich odlišný vzhľad a taxonómia sú dôkladne opísané v literatúre pod číslami (1) (2). *Lemna gibba* a *Lemna minor* sú druhy zastúpené v miernych pásmach a bežne sa používajú na testy toxicity. Obidva druhy majú plávajúcu alebo ponorenú byľ v tvare disku (lístok) a veľmi tenký koreň vychádzajúci zo stredu spodnej plochy každého lístka. Rastliny rodu *Lemna* zriedkavo vytvárajú kvety a rozmnožujú sa vegetatívne vytváraním nových lístkov (3). Mladšie rastliny v porovnaní so staršími bývajú bledšie, majú kratšie korene a skladajú sa z dvoch až troch lístkov rôznych veľkostí. Malá veľkosť rastliny *Lemna,* jej jednoduchá štruktúra, nepohlavné rozmnožovanie a krátky čas vývoja umožňujú, že rastliny tohto rodu sú veľmi vhodné na laboratórne testovanie (4) (5).

Vzhľadom na pravdepodobné medzidruhové rozdiely v citlivosti sú platné iba porovnania citlivosti v rámci jedného druhu.

Príklady druhov *Lemna,* ktoré sa používajú na testovanie: literatúra k jednotlivým druhom

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Zdroje druhov *Lemna*

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

North Carolina State University

Forestry Dept

Duckweed Culture Collection

Campus Box 8002

Raleigh, NC 27695-8002

USA

phone 001 (919) 515-7572

astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University

SE-106 91

STOCKHOLM

ŠVÉDSKO

Tel: +46 8 674 7240

Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)

FG III 3.4

Schichauweg 58

12307 Berlin

NEMECKO

e-mail: lemna@uba.de

LITERATÚRA

1. Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

2. Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

3. Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

4. Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

5. Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

Dodatok 3

Uchovávanie zásobnej kultúry

Zásobné kultúry sa môžu dlhší čas uchovávať pri nižších teplotách (4 – 10 °C) bez toho, aby ich bolo potrebné opätovne pripraviť. Rastové médium pre rastliny rodu *Lemna* môže byť rovnaké, ako sa používa na testovanie, ale pre zásobné kultúry sa môžu použiť iné médiá bohaté na živiny.

Pravidelne sa pomocou sterilných nástrojov premiestni množstvo mladých svetlozelených rastlín do nových kultivačných nádob obsahujúcich čerstvé médium. Pri nižšej teplote navrhnutej v tomto materiáli sa môže čiastočná kultivácia vykonávať až v trojmesačných intervaloch.

Mali by sa používať chemicky čisté (umyté v kyseline) a sterilné sklenené kultivačné nádoby a sterilné postupy. V prípade kontaminácie zásobnej kultúry, napríklad riasami alebo plesňami, je potrebné prijať opatrenia na odstránenie kontaminujúcich organizmov. V prípade rias a väčšiny iných kontaminujúcich organizmov je to možné docieliť povrchovou sterilizáciou. Odoberie sa vzorka kontaminovaného rastlinného materiálu a korienky sa odstrihnú. Následne sa materiál prudko pretrepe v čistej vode, následne sa ponorí do 0,5 % (v/v) roztoku chlórnanu sodného na 30 sekúnd až 5 minút. Rastlinný materiál sa potom opláchne sterilnou vodou a prenesie v niekoľkých dávkach do kultivačných nádob obsahujúcich čerstvé rastové médium. V dôsledku tohto postupu veľa lístkov uhynie, najmä ak sa použijú dlhšie expozičné časy, ale tie, ktoré prežijú, sú obvykle nekontaminované. Tieto sa môžu potom použiť na opätovné naočkovanie nových kultúr.

Dodatok 4

Médiá

Odporúčajú sa rôzne rastové médiá pre druhy *L. minor* a *L. gibba*. Pre *L. minor* sa odporúča modifikované médium podľa švédskej normy (SIS), zatiaľ čo pre *L. gibba* sa odporúča médium 20X AAP. Zloženia obidvoch médií sú uvedené nižšie. Pri príprave týchto médií sa musia použiť reagenty alebo chemikálie analytickej kvality a deionizovaná voda.

Rastové médium podľa švédskej normy (SIS) pre rastliny rodu *Lemna*

— Zásobné roztoky I – V sa sterilizujú v autokláve (120 °C, 15 minút) alebo membránovou filtráciou (veľkosť pórov približne 0,2 µm).

— Zásobný roztok VI (a voliteľne VII) sa sterilizuje iba membránovou filtráciou, nie je potrebné ho autoklávovať.

— Sterilné zásobné roztoky by sa mali skladovať v chlade a tme. Zásobné roztoky I – V by sa mali vyradiť po šiestich mesiacoch, zatiaľ čo zásobný roztok VI (a voliteľne VII) má čas použiteľnosti jeden mesiac.

Číslo zásobného roztoku:	Látka	Koncentrácia v zásobnom roztoku (g/l)	Koncentrácia v pripravenom médiu (mg/•l)	Pripravené médium	
				Prvok	Koncentrácia (mg/•l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tlmiaci roztok)	490	490	—	—

Na prípravu jedného litra média SIS sa do 900 ml deionizovanej vody pridá:

— 10 ml zásobného roztoku I,

— 5 ml zásobného roztoku II,

— 5 ml zásobného roztoku III,

— 5 ml zásobného roztoku IV,

— 1 ml zásobného roztoku V,

— 5 ml zásobného roztoku VI,

— 1 ml zásobného roztoku VII (voliteľné).

Poznámka: Ďalší zásobný roztok VII (tlmivý roztok MOPS) môže byť potrebný pre určité testované chemikálie (pozri bod 11).

Hodnota pH sa nastaví na 6,5 ± 0,2 pridaním 0,1 alebo 1 mol HCl alebo NaOH a objem sa doplní do jedného litra deionizovanou vodou.

Rastové médium 20X AAP

Zásobné roztoky sa pripravia v sterilnej destilovanej alebo deionizovanej vode.

Sterilné zásobné roztoky by sa mali skladovať v chlade a tme. V týchto podmienkach budú mať zásobné roztoky čas použiteľnosti minimálne 6 až 8 týždňov.

Pre médium 20X – AAP sa pripraví päť živných zásobných roztokov (A1, A2, A3, B a C) a použijú sa chemikálie reagenčnej kvality. Na prípravu rastového média sa pridá 20 ml každého živného zásobného roztoku do približne 850 ml deionizovanej vody. Hodnota pH sa nastaví na 7,5 ± 0,1 pridaním 0,1 alebo 1 mol HCl alebo NaOH a objem sa doplní do jedného litra deionizovanou vodou. Médium sa potom prefiltruje do sterilnej nádoby cez 0,2 µm (približne) membránový filter.

Rastové médium určené na testovanie by sa malo pripraviť jeden až dva dni pred použitím, aby sa stabilizovala hodnota pH. Pred použitím sa skontroluje pH rastového média a v prípade potreby sa znovu upraví pridaním 0,1 alebo 1 mol NaOH alebo HCl, ako sa uvádza vyššie.

Číslo zásobného roztoku:	Látka	Koncentrácia v zásobnom roztoku (g/•l) (*)	Koncentrácia v pripravenom médiu (mg/•l) (*)	Pripravené médium	
				Prvok	Koncentrácia (mg/•l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na;N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2.O$	1,4	30	K;P	9,4; 3,7

Číslo zásobného roztoku:	Látka	Koncentrácia v zásobnom roztoku (g/•l) (*)	Koncentrácia v pripravenom médiu (mg/•l) (*)	Pripravené médium	
				Prvok	Koncentrácia (mg/•l) (*)
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA.2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Pokiaľ nie je známa.

Poznámka: Teoreticky vhodná konečná koncentrácia hydrogénuhličitanu (ktorým by sa zabránilo značnému upravovaniu pH) je 15 mg/l a nie 300 mg/l. Používanie média 20X – AAP v minulosti vrátane kruhového testu pre túto metódu je založené na koncentrácii 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse a 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.)

STEINBERGOVO médium (podľa normy ISO 20079)

Koncentrácie a zásobné roztoky

Modifikované Steinbergovo médium sa používa v rámci normy ISO 20079 len pre druh *Lemna minor* (lebo iba druh *Lemna minor* je v tomto prípade povolený), ale z testov vyplýva, že dobré výsledky je možné dosiahnuť aj s druhom *Lemna gibba*.

Pri príprave média by sa mali použiť chemikálie reagenčnej alebo analytickej kvality a deionizovaná voda.

Pripraví sa médium obsahujúce živiny zo zásobných roztokov alebo desaťnásobne koncentrované médium, ktoré umožňuje maximálnu koncentráciu média bez vyzrážania.

Tabuľka 1

STEINBERGOVO médium so stabilizovanou hodnotou pH (modifikované podľa Altenburgera)

Zložka		Médium obsahujúce živiny	
makroprvky	molárna hmotnosť	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

Zložka		Médium obsahujúce živiny	
mikroprvky	molárna hmotnosť	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA dinátrium-dihydrát	372,24	1 500,0	4,03

Tabuľka 2

Zásobné roztoky (makroprvky)

1. Makroprvky (50-krát koncentrovaný)	**(g/l)**
Zásobný roztok 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Zásobný roztok 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Zásobný roztok 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabuľka 3

Zásobné roztoky (mikroprvky)

2. Mikroprvky (1 000-krát koncentrovaný)	**mg/l**
Zásobný roztok 4:	
H_3BO_3	120,0
Zásobný roztok 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Zásobný roztok 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0

2. Mikroprvky (1 000-krát koncentrovaný)	mg/l
Zásobný roztok 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Zásobný roztok 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dinátrium-dihydrát	1 500,0

— Môžu sa použiť zásobné roztoky 2 a 3 a samostatne 4 až 7 (pri zohľadnení požadovaných koncentrácií).

— Dlhší čas použiteľnosti sa dosiahne sterilizovaním zásobných roztokov v autokláve pri teplote 121 °C počas 20 minút, prípadne sterilnou filtráciou (0,2 µm). Pre zásobný roztok 8 sa dôrazne odporúča sterilná filtrácia (0,2 µm).

Príprava konečnej koncentrácie STEINBERGOVHO média (modifikované)

— Do približne 900 ml deionizovanej vody sa pridá 20 ml zásobných roztokov 1, 2 a 3 (pozri tabuľku 2), aby sa zabránilo vyzrážaniu.

— Pridá sa 1,0 ml zásobných roztokov 4, 5, 6, 7 a 8 (pozri tabuľku 3).

— Hodnota pH by mala byť 5,5 ± 0,2 (upraví sa pridaním minimálneho objemu roztoku NaOH alebo HCl).

— Doplní sa vodou do 1 000 ml.

— Ak sú zásobné roztoky sterilné a použije sa vhodná voda, ďalšia sterilizácia nie je potrebná. Ak sa sterilizuje konečné médium, zásobný roztok 8 by sa mal pridať po autoklávovaní (pri teplote 121 °C počas 20 minút).

Príprava desaťkrát koncentrovaného STEINBERGOVHO média (modifikovaného) na dočasné skladovanie

— Do približne 30 ml deionizovanej vody sa pridá 20 ml zásobných roztokov 1, 2 a 3 (pozri tabuľku 2), aby sa zabránilo vyzrážaniu.

— Pridá sa 1,0 ml zásobných roztokov 4, 5, 6, 7 a 8 (pozri tabuľku 3). Doplní sa vodou do 100 ml.

— Ak sú zásobné roztoky sterilné a použije sa vhodná voda, ďalšia sterilizácia nie je potrebná. Ak sa sterilizuje konečné médium, zásobný roztok 8 by sa mal pridať po autoklávovaní (pri teplote 121 °C počas 20 minút).

— Hodnota pH média (konečná koncentrácia) by mala byť 5,5 ± 0,2.“

6. Dopĺňajú sa kapitoly C.31 až C.46:

„C.31. **TEST SUCHOZEMSKÝCH RASTLÍN: TEST VZCHÁDZANIA SEMIEN A RASTU SADENÍC**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 208 (2006). Testovacie metódy sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok a použiteľnosť na regulačné účely. Táto aktualizovaná testovacia metóda je určená na hodnotenie možných účinkov chemikálií na vzchádzanie semien a rast sadeníc. Nevzťahuje sa na chronické účinky alebo účinky na reprodukciu (t. j. prípravu osiva, tvorbu kvetov, dozrievanie plodov). Posúdiť sa musia podmienky expozície a vlastnosti chemikálie, ktorá sa má testovať, aby sa zabezpečilo použitie vhodných testovacích metód (napr. pri testovaní kovov/kovových zlúčenín by sa mali posúdiť účinky pH a súvisiacich iónov s opačnými nábojmi) (1). Táto testovacia metóda sa nevzťahuje na rastliny vystavené pôsobeniu pár chemikálií. Použiteľná je na testovanie všeobecných chemikálií, biocídov a výrobkov na ochranu plodín (známych aj ako prípravky na ochranu rastlín alebo pesticídy). Metóda bola vyvinutá na základe existujúcich metód uvedených v literatúre pod číslami (2) (3) (4) (5) (6) (7). Uvádzajú sa aj ďalšie odkazy týkajúce sa testovania rastlín pod číslami (8) (9) (10). Vymedzenie použitých pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

2. Týmto testom sa hodnotia účinky na rast sadeníc a skorý rast vyšších rastlín po expozícii testovanej chemikálii v pôde (alebo inej vhodnej pôdnej matrici). Semená sa vystavia styku s pôdou s aplikovanou testovanou chemikáliou a hodnotia sa účinky po uplynutí zvyčajne 14 – 21 dní po vzídení sadenice v kontrolnej skupine o 50 %. Meranými konečnými parametrami sú vizuálne posúdenie vzchádzania sadeníc, suchá hmotnosť výhonkov (prípadne čerstvá hmotnosť výhonkov) a v niektorých prípadoch výška výhonku, ako aj posúdenie viditeľných škodlivých účinkov na rôzne časti rastliny. Tieto merania a pozorovania sa porovnávajú s meraniami a pozorovaniami kontrolných rastlín bez aplikovanej chemikálie.

3. V závislosti od očakávaného spôsobu expozície sa testovaná chemikália pridá do pôdy (prípadne do matrice s umelo pripravenou pôdou) alebo sa aplikuje na povrch pôdy, čo primerane reprezentuje potenciálny spôsob expozície chemikálie. Pri pridávaní do pôdy sa chemikália aplikuje do určitého objemu voľnej pôdy. Po aplikácii sa pôda prenesie do nádob a následne sa semená daného rastlinného druhu vysadia do pôdy. Povrchové aplikácie sa robia na pôdu v nádobách, do ktorej boli semená už vysadené. Testovacie jednotky (kontrolné vzorky, vzorky pôdy s aplikovanou chemikáliou a semená) sa následne umiestnia do vhodných podmienok na podporu klíčenia/rastu rastlín.

4. Podľa zámeru štúdie sa test môže vykonať s cieľom zostrojiť krivku závislosti odozvy od dávky, alebo ako limitný test jednej koncentrácie/dávky. Ak výsledky testu jednej koncentrácie/dávky prekročia určitú úroveň toxicity (napr. ak boli zaznamenané väčšie účinky než x %), vykoná sa test na vyhľadávanie rozsahu, ktorým sa stanoví horné a dolné hranice toxicity, a následne sa vykoná viacnásobný test koncentrácie/dávky na vytvorenie krivky závislosti odozvy od dávky. Na získanie hodnôt účinnej koncentrácie EC_x alebo účinnej aplikačnej dávky ER_x (napr. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) pre najcitlivejšie sledovaný parameter, resp. parametre sa používa vhodná štatistická analýza. V rámci tohto testu sa môžu vypočítať aj hodnoty koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC) a najnižšej koncentrácie s pozorovaným účinkom (LOEC).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

5. Pri identifikácii očakávaného spôsobu expozície chemikálie a pri navrhovaní testu sú užitočné tieto informácie: štrukturálny vzorec, čistota, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v organických rozpúšťadlách, rozdeľovacia konštanta 1-oktanol/voda, sorpčné vlastnosti pôdy, tlak pary, chemická stabilita vo vode a na svetle a biodegradovateľnosť.

PLATNOSŤ TESTU

6. Na to, aby bol test platný, je potrebné v kontrolných vzorkách splniť tieto kritériá:

— vzchádzanie semien (sadeníc) dosahuje najmenej 70 %,

— sadenice nevykazujú viditeľné fytotoxické účinky (napr. chlorózu, nekrózu, vädnutie, deformácie listov a stoniek) a rastliny vykazujú len rozdiely v raste a morfológii bežné pre daný druh,

— stredná miera prežitia vzídených kontrolných sadeníc počas celej štúdie je najmenej 90 %,

— environmentálne podmienky pre jednotlivé druhy sú rovnaké a rastové médiá obsahujú rovnaké množstvo pôdnej matrice, podporných médií alebo substrátu z rovnakého zdroja.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

7. Referenčná chemikália sa môže testovať v pravidelných intervaloch s cieľom overiť, či sa vykonanie testu, reakcia príslušných testovacích rastlín a podmienky testu postupom času výrazne nezmenili. Alternatívne by sa staršie merania množstva biomasy alebo rastu kontrolných vzoriek mohli použiť na hodnotenie výkonnosti testovacieho systému v konkrétnych laboratóriách a môžu slúžiť ako prostriedok kontroly kvality v rámci jednotlivých laboratórií.

OPIS METÓDY

Prirodzená pôda – umelý substrát

8. Rastliny sa môžu pestovať v nádobách v pieskovohlinitej pôde, hlinitopieskovej pôde alebo pieskovoílovitej hline, ktorá obsahuje až 1,5 % organického uhlíka (približne 3 % organickej hmoty). Použiť sa môže aj komerčná záhradkárska zemina alebo syntetická pôdna zmes s obsahom do 1,5 % organického uhlíka. Ílovité pôdy by sa nemali používať, ak je testovaná chemikália známa vysokou afinitou k ílom. Pôda z poľa by sa mala preosiať na veľkosť častíc 2 mm s cieľom zhomogenizovať ju a odstrániť z nej veľké častice. Zaznamenať by sa mal typ a štruktúra konečnej pripravenej pôdy, jej percentuálny obsah organického uhlíka, pH a obsah soli ako parameter elektrónovej vodivosti. Pôda by sa mala klasifikovať podľa štandardnej klasifikačnej schémy (11). Pôda by sa mohla pasterizovať alebo tepelne ošetriť s cieľom znížiť vplyv pôdnych patogénov.

9. Prírodná pôda môže skomplikovať interpretáciu výsledkov a zvýšiť ich premenlivosť v dôsledku premenlivých fyzikálnych/chemických vlastností a mikrobiálnych populácií. Tieto premenné následne menia schopnosť zadržiavania vlhkosti, schopnosť vytvárania chemických väzieb, prevdzušňovanie a obsah živín a stopových prvkov. Okrem premenlivosti týchto fyzikálnych faktorov sa vyskytnú aj zmeny v chemických vlastnostiach, ako je napríklad pH a oxidačno-redukčný potenciál, ktoré môžu ovplyvniť biodostupnosť testovanej chemikálie (12) (13) (14).

10. Umelé substráty sa spravidla nepoužívajú na testovanie výrobkov na ochranu plodín, ale môžu sa použiť na testovanie všeobecných chemikálií, alebo ak je žiaduce, aby sa minimalizovala premenlivosť prírodnej pôdy a zvýšila porovnateľnosť výsledkov testu. Použité substráty by mali byť zložené z inertných materiálov, ktoré minimalizujú interakciu s testovanou chemikáliou, nosným rozpúšťadlom alebo obidvoma. Kyselinou premytý kremenný piesok, minerálna vlna a sklené guľôčky (s priemerom napríklad 0,35 – 0,85 mm) sú vhodné inertné materiály, ktoré minimálne absorbujú testovanú chemikáliu (15), aby sa zabezpečilo, že chemikália bude maximálne dostupná sadenici prostredníctvom koreňa. Medzi nevhodné substráty patria vermikulit, perlit alebo iné vysokoabsorpčné materiály. Na to, aby rastliny netrpeli nedostatkom výživy, mali by sa im dodávať živiny potrebné na ich rast. Ak je to možné, potreba živín by sa mala posúdiť prostredníctvom chemickej analýzy alebo vizuálnym hodnotením kontrolných rastlín.

Kritériá pre výber testovaných druhov

11. Výber druhov by mal byť dostatočne široký, napríklad vzhľadom na ich taxonomickú diverzitu v rastlinnej ríši, ich rozdelenie, hojnosť, osobitné charakteristiky životného cyklu druhov a región prirodzeného výskytu, aby vznikol dostatočne široký rozsah reakcií (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Pri výbere by sa mali zohľadniť tieto charakteristiky možných testovacích druhov:

— použité druhy majú jednotné semená, ktoré sú ľahko dostupné zo spoľahlivých štandardných zdrojov osiva, ich klíčenie je konzistentné, spoľahlivé a rovnomerné a rast sadeníc je tiež rovnomerný,

— rastlinu je možné testovať v laboratóriu a môže poskytnúť spoľahlivé a reprodukovateľné výsledky v rámci rôznych testovacích zariadení,

— citlivosť testovacích druhov by mala byť v súlade s reakciami rastlín vystavených účinkom chemikálie v prírodnom prostredí,

— do určitej miery sa využívali v predchádzajúcich testoch toxicity a ich použitie, napríklad v rámci biologických testov herbicídov, skríningových testov ťažkých kovov, stresových testov slanosti alebo minerálov alebo štúdií alelopatie, ukazuje citlivosť na širokú škálu stresových faktorov,

— sú zlučiteľné s rastovými podmienkami testovacej metódy,

— spĺňajú kritériá platnosti testu.

Niektoré v minulosti použité testovacie druhy sú uvedené v dodatku 2 a potenciálne druhy iné ako plodiny v dodatku 3.

12. Počet druhov, ktoré sa majú testovať, závisí od príslušných regulačných požiadaviek, preto nie je uvedený v tejto testovacej metóde.

Aplikácia testovanej chemikálie

13. Chemikália by sa mala aplikovať vo vhodnom nosiči (napr. voda, acetón, etanol, polyetylénglykol, arabská guma, piesok). Testovať sa môžu aj zmesi (pripravené výrobky alebo prípravky), ktoré obsahujú účinné zložky a rozličné pomocné látky.

Pridávanie do pôdy/do umelého substrátu

14. Chemikálie, ktoré sú rozpustné vo vode alebo suspendované vo vode, sa môžu pridať do vody a potom sa roztok zmieša s pôdou pomocou vhodného miešacieho zariadenia. Tento typ testu môže byť vhodný, ak k expozícii chemikálie dochádza cez pôdu alebo cez vodu, ktorá sa nachádza v pôdnych póroch, pričom existujú obavy o prenos koreňmi. Pridaním testovanej chemikálie by sa nemala prekročiť pôdna kapacita retencie vody. Objem pridanej vody by mal byť rovnaký pre každú testovanú koncentráciu, ale mal by byť obmedzený tak, aby nedochádzalo k vytváraniu zhlukov v pôde.

15. Chemikálie s nízkou rozpustnosťou vo vode by sa mali rozpustiť vo vhodnom prchavom rozpúšťadle (napr. acetón, etanol) a zmiešať s pieskom. Rozpúšťadlo sa potom môže z piesku odstrániť pomocou prúdu vzduchu za nepretržitého premiešavania piesku. Piesok s aplikovanou chemikáliou sa zmieša s experimentálnou pôdou. Vytvorí sa druhá kontrolná vzorka, do ktorej sa pridá iba piesok a rozpúšťadlo. Do vzoriek s aplikovanou chemikáliou všetkých koncentrácií a do druhej kontrolnej vzorky sa pridá rovnaké množstvo piesku so zamiešaným a následne odstráneným rozpúšťadlom. V prípade tuhých, nerozpustných testovaných chemikálií sa vo vhodnom miešacom zariadení zmieša suchá pôda s chemikáliou. Pôda sa potom pridá do nádob a okamžite sa zasadia semená.

16. Ak sa namiesto pôdy používa umelý substrát, chemikálie, ktoré sú rozpustné vo vode, sa môžu rozpustiť v živnom roztoku tesne pred začiatkom testu. Chemikálie, ktoré nie sú rozpustné vo vode, ale je možné ich suspendovať vo vode pomocou nosiča, ktorým je rozpúšťadlo, by sa mali pridať do živného roztoku s nosičom. Chemikálie, ktoré nie sú rozpustné vo vode a pre ktoré nie je k dispozícii netoxický nosič rozpustný vo vode, by sa mali rozpustiť vo vhodnom prchavom rozpúšťadle. Roztok sa zmieša s pieskom alebo sklenými guľôčkami, vloží do rotačného vákuového zariadenia a odparí, pričom vznikne rovnomerný nános chemikálie na piesku alebo guľôčkach. Pred naplnením nádob by sa mala odvážená časť guľôčok extrahovať rovnakým organickým rozpúšťadlom a testovanou chemikáliou.

Povrchová aplikácia

17. V prípade výrobkov na ochranu plodín sa pri aplikácii testovanej chemikálie často používa striekanie testovacieho roztoku na povrch pôdy. Všetko vybavenie, ktoré sa používa na vykonávanie testov, vrátane zariadenia používaného na prípravu a podávanie testovanej chemikálie, by malo mať takú konštrukciu a kapacitu, aby bolo možné testy s týmto vybavením vykonať presne a s reprodukovateľným pokrytím. Pokrytie by malo byť jednotné na celej ploche pôdy. Je potrebné dbať na to, aby sa zabránilo možnosti adsorbovania chemikálií alebo ich reagovania v styku so zariadením (napr. plastovými rúrkami a lipofilnými chemikáliami alebo oceľovými časťami a prvkami). Testovaná chemikália sa rozstrieka na povrch pôdy tak, aby sa simulovala typická aplikácia postrekom z cisterny. Vo všeobecnosti by sa mal objem rozstriekanej chemikálie pohybovať v rozsahu normálnej poľnohospodárskej praxe a používaných objemov (množstvo vody atď. by sa malo zaznamenať). Typ dýzy by sa mal zvoliť tak, aby sa zabezpečilo rovnomerné pokrytie povrchu pôdy. Ak sa používajú rozpúšťadlá a nosiče, mala by sa vytvoriť druhá skupina kontrolných rastlín, pri ktorých by sa použilo iba rozpúšťadlo/nosič. To nie je potrebné v prípade výrobkov na ochranu plodín, ktoré sa testujú ako prípravky.

Overovanie koncentrácie/dávky testovanej chemikálie

18. Hodnoty koncentrácií/dávok aplikácie sa musia potvrdiť príslušným analytickým overovaním. V prípade rozpustných chemikálií sa všetky testovacie koncentrácie/dávky môžu potvrdiť analýzou najvyššej koncentrácie testovacieho roztoku použitého na test, s dokumentáciou o následnom riedení a o používaní kalibrovaného aplikačného zariadenia (napr. kalibrovaného analytického skla, kalibrovaného postrekovacieho aplikačného zariadenia). V prípade nerozpustných chemikálií sa na overovanie materiálu zlúčeniny musia použiť hmotnosti testovanej chemikálie pridané do pôdy. Ak sa vyžaduje preukázanie homogénnosti, môže byť potrebná analýza pôdy.

POSTUP

Koncepcia testu

19. Semená toho istého druhu sa pestujú v príslušných nádobách. Počet semien zasadených do každej nádoby bude závisieť od druhu rastliny, veľkosti nádoby a trvania testu. Počet rastlín v nádobe by mal zabezpečiť vhodné podmienky na rast a zabrániť preplneniu nádoby v priebehu testu. Maximálna hustota výsadby je približne 3 až 10 semien na 100 cm^2 v závislosti od veľkosti semien. Napríklad do nádoby s priemerom 15 cm sa odporúča zasadiť jednu až dve rastliny kukurice, sóje, rajčiaku, uhorky alebo cukrovej repy, tri rastliny repky alebo hrachu a 5 až 10 semien cibule, pšenice alebo iných malých semien. Počet semien a paralelných nádob (replikát sa vymedzuje ako paralelná nádoba, takže rastliny v rámci tej istej nádoby netvoria replikát) by mal byť primeraný pre optimálnu štatistickú analýzu (21). Je potrebné si uvedomiť, že variabilita bude vyššia v prípade testovaných druhov, v prípade ktorých sa v každej nádobe (replikáte) použije menší počet veľkých semien v porovnaní s testovacím druhom, pri ktorom sa v každej nádobe môže použiť väčší počet malých semien. Zasadením rovnakého počtu semien do každej nádoby sa táto variabilita môže minimalizovať.

20. Kontrolné skupiny sa používajú s cieľom zabezpečiť, aby pozorované účinky boli spájané len s expozíciou testovanej chemikálie alebo sa expozícii testovanej chemikálie pripisovali. Vhodná kontrolná skupina by mala byť v každom ohľade identická s testovacou skupinou, okrem expozície účinkom testovanej chemikálie. V rámci daného testu by všetky testovacie rastliny vrátane kontrolných mali pochádzať z toho istého zdroja. S cieľom predísť ovplyvňovaniu je potrebné náhodné zaraďovanie testovacích a kontrolných nádob.

21. Používať by sa nemali semená obaľované insekticídom alebo herbicídom (t. j. upravené semená). Použitie určitých nesystémových kontaktných fungicídov (napr. kaptánu, tirámu) však niektoré regulačné orgány povoľujú (22). Ak existuje možnosť výskytu patogénov prenášaných semenami, semená sa môžu nakrátko namočiť do slabého, 5 % roztoku chlórnanu, potom sa dôkladne opláchnu v tečúcej vode a vysušia. Žiadne ošetrenie iným výrobkom na ochranu plodín nie je povolené.

Podmienky testu

22. Podmienky testu by sa mali približovať podmienkam potrebným na normálny rast testovacích druhov a odrôd (príklady podmienok testu sú uvedené v dodatku 4). Klíčiace rastliny by sa mali udržiavať správnymi záhradníckymi postupmi v kontrolovanom prostredí komôr, fytotrónov alebo skleníkov. Pri použití rastových zariadení tieto postupy zvyčajne zahŕňajú kontrolu a primerane časté (napr. denné) zaznamenávanie teploty, vlhkosti, koncentrácie oxidu uhličitého, svetla (intenzity, vlnovej dĺžky, fotosynteticky aktívneho žiarenia) a času osvetlenia, spôsobu zavlažovania atď., s cieľom zabezpečiť správny rast rastlín v porovnaní s kontrolnými rastlinami vybratých druhov. Teplota v skleníku by sa mala regulovať prostredníctvom systémov vetrania, vykurovania a/alebo chladenia. Na testovanie v skleníkoch sa vo všeobecnosti odporúčajú tieto podmienky:

— teplota: 22 °C ± 10 °C,

— vlhkosť: 70 % ± 25 %,

— fotoperióda: minimálne 16 hodín svetla,

— svietivosť: 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$. Môže byť potrebné doplnkové osvetlenie, ak intenzita klesne pod hodnotu 200 $\mu E/m^2/s$ pri vlnových dĺžkach 400 – 700 nm, s výnimkou určitých druhov, ktorých požiadavky na svetlo sú nižšie.

Podmienky prostredia by sa mali v priebehu štúdie monitorovať a zaznamenávať. Rastliny by sa mali pestovať v nepórovitých plastových alebo glazovaných nádobách s podložkou alebo miskou pod nádobou. Nádoby sa môžu pravidelne premiestňovať s cieľom minimalizovať variabilitu v raste rastlín (vzhľadom na rozdiely v podmienkach testu v rámci rastových zariadení). Nádoby musia byť dostatočne veľké, aby umožnili normálny rast.

23. Pôdne živiny sa môžu podľa potreby dopĺňať, aby sa zachovala vysoká životaschopnosť rastlín. Potreba a časovanie ďalších živín je možné posúdiť pozorovaním kontrolných rastlín. Odporúča sa spodné dopĺňanie vody do testovacích nádob (napr. pomocou knôtov zo sklenených vlákien). Počiatočné vrchné zavlažovanie sa však môže využiť na stimuláciu klíčenia semena a v prípade aplikácie na povrchu pôdy uľahčuje pohyb chemikálie do pôdy.

24. Osobitné podmienky rastu by mali byť vhodné pre skúmaný testovací druh a testovanú chemikáliu. Kontrolné rastliny a rastliny s aplikovanou chemikáliou sa musia uchovávať v rovnakých podmienkach prostredia, mali by sa však prijať primerané opatrenia, aby sa zabránilo krížovej expozícii (napr. prchavých chemikálií) medzi jednotlivými rastlinami s aplikovanou chemikáliou a kontrolných rastlín testovacím chemikáliám.

Testovanie s jednou koncentráciou/dávkou

25. Pri určovaní vhodnej koncentrácie/dávky chemikálie na vykonanie testu s jednou koncentráciou alebo dávkou (kontrolný/limitný test) je potrebné zvážiť viaceré faktory. V prípade všeobecných chemikálií to zahŕňa fyzikálne/chemické vlastnosti danej chemikálie. V prípade výrobkov na ochranu plodín je potrebné zvážiť fyzikálne/chemické vlastnosti a spôsob použitia testovanej chemikálie, jej maximálnu koncentráciu alebo aplikačnú dávku, počet aplikácií za sezónu a/alebo perzistenciu testovanej chemikálie. Na zistenie, či všeobecná chemikália má fytotoxické vlastnosti, môže byť vhodné vykonať test pri maximálnej hladine 1 000 mg/kg suchej pôdy.

Test na vyhľadávanie rozsahu

26. V prípade potreby sa môže vykonať test na vyhľadávanie rozsahu, poskytujúci usmernenie týkajúce sa koncentrácií/dávok, ktoré sa majú testovať v rámci konečnej štúdie odozvy na dávku. Pri teste na vyhľadávanie rozsahu by hodnoty testovacích koncentrácií/dávok mali mať veľké rozstupy (napr. 0,1, 1, 10, 100 a 1 000 mg/kg suchej pôdy). V prípade výrobkov na ochranu plodín by sa hodnoty koncentrácií/dávok mohli zakladať na odporúčaných alebo maximálnych hodnotách koncentrácie alebo aplikačnej dávky, napríklad 1/100, 1/10, 1/1 odporúčanej/maximálnej koncentrácie alebo aplikačnej dávky.

Testovanie s viacerými koncentráciami/dávkami

27. Účelom testu s viacerými koncentráciami/dávkami je určiť vzťah dávky a účinku a stanoviť hodnotu EC_x alebo ER_x pre vzchádzanie, biomasu a/alebo vizuálne účinky v porovnaní s kontrolnými rastlinami bez expozície tak, ako to vyžadujú regulačné orgány.

28. Počet a rozstup hodnôt koncentrácie alebo dávky by mal byť dostatočný na vytvorenie spoľahlivého vzťahu dávky a účinku a príslušnej regresnej rovnice, ako aj na stanovenie odhadu hodnoty EC_x alebo ER_x. Zvolené koncentrácie/dávky by mali zahŕňať hodnoty EC_x alebo ER_x, ktoré treba určiť. Napríklad, ak sa požaduje hodnota koncentrácie EC_{50}, bolo by žiaduce vykonať test s dávkami, ktoré vytvárajú účinok 20 – 80 %. Na dosiahnutie tohto cieľa sa odporúča použiť najmenej päť testovacích koncentrácií/dávok v geometrickom rade, spolu s kontrolnými vzorkami bez aplikovanej chemikálie, pričom faktor rozstupu medzi hodnotami by nemal presahovať tri. Počet replikátov pre každú skupinu s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú skupinu by mal byť najmenej štyri a celkový počet semien by mal byť najmenej 20. V prípade väčšieho počtu replikátov určitých rastlín s nízkou rýchlosťou klíčenia alebo variabilnými spôsobmi rastu môže byť potrebné zvýšiť štatistickú významnosť testu. Ak sa použije väčší počet testovacích koncentrácií/dávok, počet replikátov sa môže znížiť. Ak sa má odhadnúť hodnota koncentrácie NOEC, na dosiahnutie želanej štatistickej významnosti môže byť potrebných viac replikátov (23).

Pozorovania

29. Počas sledovaného obdobia, t. j. 14 až 21 dní od vyklíčenia 50 % kontrolných rastlín (prípadne aj kontrol s aplikáciou rozpúšťadla), sa rastliny často pozorujú (najmenej raz týždenne, a ak je to možné, denne), pričom sa sleduje klíčenie a vizuálna fytotoxicita a mortalita. Na konci testu by sa mali zaznamenať výsledky merania percentuálnych hodnôt vzchádzania a množstva biomasy rastlín, ktoré prežili, ako aj viditeľné škodlivé účinky na rôzne časti rastliny. Medzi viditeľné škodlivé účinky patria abnormality vo vzhľade vzídených sadeníc, zastavený rast, chloróza, úbytok farby, mortalita a účinky na vývoj rastliny. Konečné množstvo biomasy je možné merať pomocou konečnej priemernej sušiny vo výhonkoch rastlín, ktoré prežili. Výhonky na povrchu pôdy na zozbierajú a vysušia na konštantnú hmotnosť pri teplote 60 °C. Alternatívne sa konečné množstvo biomasy môže merať pomocou hmotnosti výhonkov v čerstvom stave. Ďalším konečným parametrom môže byť výška výhonku, ak to vyžadujú regulačné orgány. Na hodnotenie pozorovateľných toxických reakcií by sa mal použiť jednotný systém hodnotenia viditeľného poškodenia. Príklady kvalitatívneho a kvantitatívneho vizuálneho hodnotenia sú uvedené v literatúre pod číslami (23) (24).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Štatistická analýza

Test s jednou koncentráciou/dávkou

30. Údaje pre každý rastlinný druh by sa mali analyzovať s použitím vhodnej štatistickej metódy (21). V správe by sa mala uviesť úroveň účinku pri testovanej koncentrácii/dávke alebo skutočnosť, že sa pri testovanej koncentrácii/dávke daný účinok nedosiahol (napr. účinok < x % pozorovaný pri koncentrácii alebo dávke y).

Test s viacerými koncentráciami/dávkami

31. Vzťah medzi dávkou a reakciou sa stanoví regresným výpočtom. Použiť sa môžu rôzne modely: napríklad na odhad hodnôt EC_x alebo ER_x (napr. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) a ich hraníc spoľahlivosti pre vzchádzanie ako kvantálny údaj by mohli byť vhodné metódy ako probitová, logitová, Weibullova, Spearman-Karberova, upravená Spearman-Karberova atď. Pre priebežné parametre rastu sadeníc (hmotnosť a výšku) sa hodnoty EC_x alebo ER_x a ich hranice spoľahlivosti môžu odhadnúť pomocou vhodnej regresnej analýzy [napríklad Bruceova-Versteegova nelineárna regresná analýza (25)]. Vždy, keď je to možné, hodnota R^2 pre najcitlivejšie druhy by mala byť 0,7 alebo vyššia a účinky použitých testovacích koncentrácií/dávok by mali byť v rozsahu 20 až 80 %. Ak sa má odhadnúť hodnota koncentrácie NOEC, uprednostniť by sa malo použitie výkonných štatistických testov a tie by sa mali vyberať na základe rozdelenia údajov (21) (26).

Protokol o skúške

32. V protokole o skúške by sa mali predložiť výsledky štúdie, ako aj podrobný opis podmienok testu, dôkladný rozbor výsledkov, analýza údajov a závery vyplývajúce z analýzy. Poskytnúť by sa malo zhrnutie vo forme tabuliek a prehľad výsledkov. Protokol musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— identifikačné údaje chemikálie, dôležité vlastnosti testovanej chemikálie (napr. hodnota log P_{ow}, rozpustnosť vo vode, tlak pary a informácie o osude a správaní látky v životnom prostredí, ak sú k dispozícii),

— podrobné údaje o testovacom roztoku a overovaní testovaných koncentrácií tak, ako sa uvádza v bode 18.

Testované druhy:

— podrobné údaje o testovacom organizme: druh/odroda, čeľaď rastliny, vedecké a bežné názvy, čo najpodrobnejšie informácie o zdroji a histórii osiva (t. j. názov dodávateľa, percentuálna klíčivosť, trieda veľkosti semena, číslo dávky alebo šarže, rok vysemenenia alebo sezóna rastu, dátum hodnotenia klíčivosti), životaschopnosť atď.,

— počet jedno- a dvojklíčnolistových testovacích druhov,

— odôvodnenie výberu druhov,

— opis skladovania, ošetrovania a udržiavania osiva.

Podmienky testu:

— testovacie zariadenie (napr. rastová komora, fytotrón a skleník),

— opis testovacieho systému (napr. rozmery nádob, materiál nádob a množstvá pôdy),

— vlastnosti pôdy (textúra alebo typ pôdy: rozdelenie a klasifikácia častíc pôdy, fyzikálne a a chemické vlastnosti vrátane percentuálneho podielu organickej hmoty, percentuálneho podielu organického uhlíka a pH),

— príprava pôdy/substrátu (napr. pôdy, umelo pripravenej pôdy, piesku a pod.) pred testom,

— opis média obsahujúceho živiny, ak sa použilo,

— aplikácia testovanej chemikálie: opis metódy aplikácie, opis vybavenia, miera a objem expozície vrátane verifikácie chemikálie, opisu kalibračnej metódy a opisu podmienok prostredia počas aplikácie,

— podmienky rastu: svietivosť (napr. fotosynteticky aktívneho žiarenia), fotoperióda, maximálne a minimálne teploty, rozpis a metóda zavlažovania, hnojenie,

— počet semien v každej nádobe, počet rastlín na dávku, počet replikátov (paralelných nádob) na mieru expozície,

— typ a počet kontrolných vzoriek (negatívne a/alebo pozitívne kontrolné vzorky, kontrolné vzorky s rozpúšťadlom, ak sa použili),

— trvanie testu.

Výsledky:

— tabuľka všetkých parametrov pre každý replikát, testovaná koncentrácia/dávka a druh rastliny,

— počet a percento vyklíčených sadeníc a vzchádzania v porovnaní s kontrolnými vzorkami,

— meranie množstva biomasy rastlín (suchej hmotnosti výhonkov alebo hmotnosti výhonkov v čerstvom stave) ako percentuálneho podielu kontrolných rastlín,

— výška výhonkov rastlín ako percentuálny podiel kontrolných rastlín, ak sa meria,

— percentuálna miera viditeľného poškodenia a kvalitatívny a kvantitatívny opis viditeľného poškodenia (chloróza, nekróza, vädnutie, deformácia listov a stonky, ako aj neprítomnosť účinkov) spôsobeného testovanou chemikáliou v porovnaní s kontrolnými rastlinami,

— opis hodnotiacej škály používanej na posúdenie viditeľného poškodenia, ak sa vizuálne hodnotenie vykonáva,

— v prípade štúdií s jednou dávkou aj percentuálna miera poškodenia,

— hodnoty EC_x alebo ER_x (napr. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) a súvisiace hranice spoľahlivosti; ak sa vykonáva regresná analýza, uvedie sa štandardná chyba pre regresný výpočet a štandardná chyba pre odhad jednotlivých parametrov (napr. sklon, úsek),

— hodnota koncentrácie NOEC (a LOEC), ak sa vypočítava,

— opis použitých štatistických postupov a predpokladov,

— grafické zobrazenie týchto údajov a vzťahu dávky a účinku testovacích druhov.

Uvedú sa odchýlky od postupov opísaných v tejto testovacej metóde a všetky nezvyčajné udalosti počas testu.

LITERATÚRA

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

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

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

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

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

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

— 850.4000: Background – Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

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

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

26. Chapter C.33 of this Annex: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Účinná zložka (alebo účinná látka) je materiál určený na vyvolanie osobitného biologického účinku (napr. na reguláciu hmyzu, reguláciu chorôb rastlín, reguláciu buriny v oblasti, kde sa aplikuje testovaná chemikália), známy aj ako technická účinná zložka, účinná látka.

Chemikália je látka alebo zmes.

Výrobky na ochranu plodín alebo prípravky na ochranu rastlín alebo pesticídy sú materiály so špecifickou biologickou aktivitou, ktoré sa úmyselne používajú na ochranu plodín pred škodcami (napr. plesňovými ochoreniami, hmyzom a konkurenčnými rastlinami).

Účinná koncentrácia x % (EC_x) alebo účinná dávka x % (ER_x) je koncentrácia alebo dávka, ktorá má za následok nežiaducu zmenu alebo modifikáciu konečného parametra testu o x % pri meraní vo vzťahu ku kontrolnej vzorke (napr. redukciu vzchádzania semien, hmotnosti výhonkov, konečného počtu prítomných rastlín alebo nárast viditeľného poškodenia o 25 % alebo 50 % by predstavovalo hodnoty EC_{25}/ER_{25} alebo EC_{50}/ER_{50}).

Vzchádzanie je objavenie sa časti klíčka (koleoptily alebo kotyledónu) nad povrchom pôdy.

Prípravok je komerčne pripravený výrobok s obsahom účinnej látky (účinnej zložky), známy aj ako konečný prípravok ([1]) alebo typický výrobok na konečné použitie.

LOEC (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom) je najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej bol pozorovaný daný účinok. Pokiaľ ide o tento test, koncentrácia zodpovedajúca hodnote LOEC má štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného expozičného času v porovnaní s kontrolnou vzorkou, a je vyššia ako hodnota NOEC.

Necieľové rastliny: ide o rastliny, ktoré sa nachádzajú mimo cieľovej oblasti. V prípade výrobkov na ochranu plodín sa to zvyčajne týka rastlín mimo oblasti s aplikovanou chemikáliou.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej nebol pozorovaný žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného expozičného času v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Fytotoxicita je súbor negatívnych odchýlok (na základe merania a vizuálneho hodnotenia) od obvyklého vzhľadu a rastu rastlín v reakcii na danú chemikáliu.

Replikát je experimentálna jednotka, ktorá predstavuje kontrolnú skupinu a/alebo skupinu s aplikovanou chemikáliou. V rámci týchto štúdií sa za replikát považuje paralelná nádoba.

Vizuálne hodnotenie je hodnotenie viditeľného poškodenia na základe pozorovaní rastlinného porastu, vitality, malformácie, chlorózy, nekrózy a celkového vzhľadu v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

([1]) Konečný prípravok je komerčne predávaný pripravený výrobok obsahujúci účinnú chemikáliu (účinnú zložku).

Dodatok 2

Zoznam druhov v minulosti používaných na testovanie rastlín

Čeľaď	Druh	Slovenský názov
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	mrkva obyčajná
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	slnečnica ročná
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	šalát siaty
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	horčica biela
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris var. chinensis*	kapusta poľná čínska
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	kapusta repková
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea var. capitata*	kapusta obyčajná hlávková
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	kapusta poľná
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	žerucha siata
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	reďkev siata
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	repa obyčajná
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	uhorka siata
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	sója fazuľová
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	fazuľa zlatá (mungo)
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	fazuľa obyčajná fazuľa záhradná
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	hrach siaty
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	senovka grécka
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	ľadenec rožkatý
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	ďatelina lúčna
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	vika siata
Linaceae	*Linum usitatissimum*	ľan siaty
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	pohánka jedlá
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	rajčiak jedlý

Čeľaď	Druh	Slovenský názov
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amarylladaceae)	*Allium cepa*	cesnak cibuľový
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	ovos siaty
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	jačmeň siaty
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	mätonoh trváci
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	ryža siata
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	raž siata
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	cirok dvojfarebný
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	pšenica letná
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	kukurica siata

Dodatok 3

Zoznam potenciálnych nepoľnohospodárskych druhov

Potenciálne druhy na testovanie toxicity rastlín podľa OECD

Poznámka: Táto tabuľka poskytuje informácie o 52 nepoľnohospodárskych druhoch (odkazy na literatúru sú uvedené v zátvorkách pri každom zápise). Údaje o klíčivosti sú prevzaté z publikovanej literatúry a slúžia len na všeobecné usmernenie. Individuálne skúsenosti sa môžu líšiť v závislosti od zdroja osiva a iných faktorov.

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť (1) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast (2)	Hĺbka sadenia (mm) (3)	Čas na klíčenie (počet dní) (4)	Osobitné postupy (5)	Test toxicity (6)	Dodávatelia osív (7)	Ďalšie odkazy (8)
APIACEAE *Torilis japónica* (torica japonská)	A, B narušené oblasti, živé ploty, pastviny (16, 19)	1,7 – 1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	studená stratifikácia (7, 14, 18, 19) môže byť potrebné dozrievanie (19) klíčenie brzdí tma (1, 19) žiadne osobitné postupy (5)	PO (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (sedmokráska obyčajná)	P lúky, orná pôda, rašeliny (16, 19)	0,09 – 0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (18, 19) žiadne osobitné postupy (4, 14)	PO (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (nevädza poľná)	A polia, blízkosť ciest, otvorené biotopy (16)	4,1 – 4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14 – 21 (100 %) (14)	žiadne osobitné postupy (2, 4)	PO (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (nevädzovec frygický pravý)	P polia, blízkosť ciest, otvorené biotopy (16, 19)	2,4 – 4,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	môže byť potrebné dozrievanie (18, 19) klíčenie brzdí tma (19) žiadne osobitné postupy (5, 14, 26)	PO (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (oman pravý)	P vlhké, narušené oblasti (16)	1 – 1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		žiadne osobitné postupy (4)	PO (4)	A, F	

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť (1) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast (2)	Hĺbka sadenia (mm) (3)	Čas na klíčenie (počet dní) (4)	Osobitné postupy (5)	Test toxicity (6)	Dodávatelia osív (7)	Ďalšie odkazy (8)
Leontodon hispidus (púpavec srstnatý)	P polia, blízkosť ciest, narušené oblasti (16, 19)	0,85 – 1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	klíčenie brzdí tma (17, 18, 19) žiadne osobitné postupy (5, 23)	PO (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (rudbekia srstnatá)	B, P narušené oblasti (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	žiadne osobitné postupy (4, 14, 33)	PO (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (zlatobyľ kanadská)	P pasienky, otvorené priestranstvá (16)	0,06 – 0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14 – 21 (11)	zmiešať s rovnakým dielom piesku a namočiť do 500 ppm GA na 24 hodín (11) žiadne osobitné postupy (4)	PO (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (voškovník)	A polia, otvorené biotopy (16)	25 – 61 (14, 29)		0(1) 5(29)		klíčenie môže brzdiť tma (1) namočiť do teplej vody na 12 hodín (29)	PRED a PO (31)	A	
Xanthium spinosum (voškovník trnitý)	A otvorené biotopy (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		skarifikácia (14) žiadne osobitné postupy (6)	PRED a PO (6)	A	
Xanthium strumarium (voškovník obyčajný)	A polia, otvorené biotopy (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10 – 20 (6, 21)		žiadne osobitné postupy (6, 14, 21)	PRED a PO (6, 21, 28, 31)	A	

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť (1) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast (2)	Hĺbka sadenia (mm) (3)	Čas na klíčenie (počet dní) (4)	Osobitné postupy (5)	Test toxicity (6)	Dodávatelia osív (7)	Ďalšie odkazy (8)
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (žerušnica lúčna)	P polia, blízkosť ciest, rašeliny (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	klíčenie brzdí tma (18, 19) žiadne osobitné postupy (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (kukučka lúčna)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	môže byť potrebné dozrievanie (18) žiadne osobitné postupy (5, 14, 15, 22 – 26)	PO (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (mrlík biely)	A medze, narušené oblasti (16, 19)	0,7 – 1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	postup sa odlišuje v závislosti od farby osiva (19) dormancia skladovaním v suchu (19) klíčenie brzdí tma (1, 18, 19) studená stratifikácia (18) žiadne osobitné postupy (14, 34)	PRED a PO (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (ľubovník bodkovaný)	P polia, orná pôda, otvorené biotopy (16, 19)	0,1 – 0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	klíčenie brzdí tma (1, 18, 19) žiadne osobitné postupy (5, 14, 15, 25, 27)	PO (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (povojník)	A blízkosť ciest, otvorené biotopy, obilné polia (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1) žiadne osobitné postupy (6, 21)	PRED a PO (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (šachor)	P orná pôda, pasienky, blízkosť ciest (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10 – 20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	klíčenie brzdí tma (1) žiadne osobitné postupy (6, 10, 14)	PRED a PO (6, 28, 31)	B	7

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť (1) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast (2)	Hĺbka sadenia (mm) (3)	Čas na klíčenie (počet dní) (4)	Osobitné postupy (5)	Test toxicity (6)	Dodávatelia osív (7)	Ďalšie odkazy (8)
FABACEAE *Lotus corniculatus* ľadenec rožkatý	P trávnaté plochy, blízkosť ciest, otvorené biotopy (16, 19)	1 – 1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikácia (14, 19) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (18, 19) žiadne osobitné postupy (23, 25)	PO (5, 23, 25)	A, D, E, F	
Senna obtusifolia (kasia sennová)	A vlhké lesy (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10 – 20 (6,9)		namočiť semená do vody na 24 hodín (9) skarifikácia (14) životaschopnosť osiva sa odlišuje v závislosti od farby (1) žiadne osobitné postupy (6)	PO (6,9)	A	
Sesbania exaltata (konope)	A aluviálne pôdy (16)	11 – 13 (9, 14)	L > D (9)	10 – 20 (9, 21)		namočiť semená do vody na 24 hodín (9) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1) žiadne osobitné postupy (21, 14)	PRED a PO (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense ďatelina lúčna	P polia, blízkosť ciest, orná pôda (16, 19)	1,4 – 1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikácia (14, 18) môže byť potrebné dozrievanie (19) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1, 19) žiadne osobitné postupy (5)	PO (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (srdcovník obyčajný)	P otvorené priestranstvá (16)	0,75 – 1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		žiadne osobitné postupy (4, 14)	PO (4)	F	
Mentha spicata (mäta klasnatá)	P vlhké oblasti (16)	2,21 (4)		0 (4)		žiadne osobitné postupy (4)	PO (4)	F	

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť [1] a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast [2]	Hĺbka sadenia (mm) [3]	Čas na klíčenie (počet dní) [4]	Osobitné postupy [5]	Test toxicity [6]	Dodávatelia osív [7]	Ďalšie odkazy [8]
Nepeta cataria (kocúrnik obyčajný)	P narušené oblasti (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		žiadne osobitné postupy (2, 4, 14)	PO (2,4)	F	
Prunella vulgaris (čiernohlávok obyčajný)	P orná pôda, trávnaté plochy, narušené oblasti (16, 19)	0,58 – 1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	klíčenie brzdí tma (18, 19) väčšie klíčenie pri väčších semenách (1) žiadne osobitné postupy (4, 14, 22)	PO (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (betonika lekárska)	P lúky, medze (19)	14 – 18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	žiadne osobitné postupy (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (abutilon)	A polia, otvorené biotopy (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10 – 20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	skarifikácia (14) žiadne osobitné postupy (5, 10, 21)	PRED a PO (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (podlsnečník)	A polia, blízkosť ciest (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10 – 20 (6, 21)		skarifikácia (14) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1) žiadne osobitné postupy (6, 21)	PRED a PO (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (mak vlčí)	A polia, orná pôda, narušené oblasti (16, 19)	0,1 – 0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	studená stratifikácia a skarifikácia (1, 19, 32) žiadne osobitné postupy (4, 14, 29)	PO (4)	A, D, E, F, G	

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť (1) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast (2)	Hĺbka sadenia (mm) (3)	Čas na klíčenie (počet dní) (4)	Osobitné postupy (5)	Test toxicity (6)	Dodávatelia osív (7)	Ďalšie odkazy (8)
POACEAE *Agrostis tenuis* (psinček tenký)	trávniky, pasienky (16)	0,07 (14)	L > D (ŁO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	klíčenie brzdí tma (1, 17 – 19) žiadne osobitné postupy (10)	PO (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (psiarka roľná)	A polia, otvorené biotopy (16)	0,9 – 1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	skarifikácia (14) ošetriť 101 mg/l KNO3 (14) teplá stratifikácia (1) klíčenie brzdí tma (1) žiadne osobitné postupy (34)	PRED a PO (28, 34)	A	32
Avena fatua (ovos hluchý)	A obrábané plochy, otvorené biotopy (16)	7 – 7,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10 – 20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	skarifikácia (7, 32) klíčenie brzdí tma (1) studená stratifikácia (1, 18) žiadne osobitné postupy (6, 10, 14)	PRED a PO (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (stoklas strechový)	A polia, blízkosť ciest, orná pôda (16)	0,45 – 2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		obdobie dozrievania (1, 7, 32) klíčenie brzdí svetlo (1) žiadne osobitné postupy (14)	PRED a PO (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (hrebienka obyčajná)	P polia, blízkosť ciest, otvorené biotopy (16, 19)	0,5 – 0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (19) žiadne osobitné postupy (14, 29)	PO (5)	A	

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť (1) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast (2)	Hĺbka sadenia (mm) (3)	Čas na klíčenie (počet dní) (4)	Osobitné postupy (5)	Test toxicity (6)	Dodávatelia osív (7)	Ďalšie odkazy (8)
Digitaria sanguinalis (rosička krvavá)	A polia, rašeliny, otvorené biotopy (16)	0,52 – 0,6 (14, 30)	L = D (14)	10 – 20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	skarifikácia, studená stratifikácia a dozrievanie (1, 7, 14, 32) ošetriť 101 mg/l KNO3 (14) klíčenie brzdí tma (1) žiadne osobitné postupy (21)	PRED a PO (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (ježatka kuria)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10 – 20 (7, 21)		skarifikácia (7, 32) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1) žiadne osobitné postupy (3, 14, 21)	PRED a PO (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (pýrovník kanadský)	P pobrežné územia, narušené oblasti (16)	4 – 5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14 – 28 (11)	žiadne osobitné postupy (2, 11)	PO (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (kostrava lúčna)	P polia, vlhké oblasti (16, 19)	1,53 – 2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	žiadne osobitné postupy (10, 19)	PO (10)	A	7
Hordeum pusillum (jačmeň)	A pasienky, blízkosť ciest, otvorené biotopy (16)	3,28 (14)				teplá stratifikácia (1) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1)	PRED (31)		7
Phieum pratense (timotejka lúčna)	P pasienky, orná pôda, narušené oblasti (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0 – 10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	klíčenie brzdí tma (19) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (17) žiadne osobitné postupy (10, 14, 17, 19)	PO (10)	A, E	

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť (1) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast (2)	Hĺbka sadenia (mm) (3)	Čas na klíčenie (počet dní) (4)	Osobitné postupy (5)	Test toxicity (6)	Dodávatelia osív (7)	Ďalšie odkazy (8)
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (pohánkovec ovíjavý)	A otvorené biotopy, blízkosť ciest (16)	5 – 8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0 – 2 (4, 29)		studená stratifikácia 4 – 8 týždňov (1, 2, 4, 20, 29) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1)	PRED a PO 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (horčiak štiavolistý)	A vlhká pôda (16)	1,8 – 2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1) klíčenie brzdí tma (18) studená stratifikácia (1) žiadne osobitné postupy (5)	PRED a PO (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (horčiak)	A polia, otvorené biotopy (16)	3,6 – 7 (14, 29)		2 (29)		studená stratifikácia 4 týždne pri teplote 0 – 5 °C (1, 29) klíčenie brzdí tma (1)	PRED (31)	A, E	
Polygonum periscaria (horčiak broskyňolistý)	A narušené oblasti, orná pôda (16, 19)	2,1 – 2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	skarifikácia, studená stratifikácia, ošetrenie GA (14) studená stratifikácia, dozrievanie (17 – 19) klíčenie brzdí tma (19) žiadne osobitné postupy (13)	PO (13)	A	32
Rumex crispus (štiavec kučeravý)	P orná pôda, blízkosť ciest, otvorené priestranstvá (16, 19)	1,3 – 1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	klíčenie brzdí tma (18, 19) môže byť potrebné dozrievanie (18) žiadne osobitné postupy (4, 14, 33)	PO (4, 33)	A, E	32

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť (1) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast (2)	Hĺbka sadenia (mm) (3)	Čas na klíčenie (počet dní) (4)	Osobitné postupy (5)	Test toxicity (6)	Dodávatelia osív (7)	Ďalšie odkazy (8)
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (drchnička roľná)	A orná pôda, otvorené priestranstvá, narušené oblasti (16, 19)	0,4 – 0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	studená stratifikácia, ošetrenie GA (1,14, 18, 19, 32) na klíčenie je potrebné svetlo (1) žiadne osobitné postupy (2, 4)	PO (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (iskerník prudký)	P orná pôda, blízkosť ciest, otvorené priestranstvá (16, 19)	1,5 – 2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 – 56 (19, 29)	žiadne osobitné postupy (5, 14, 22, 24 – 26)	PO (5, 22, 24 – 26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (kuklík mestský)	P živé ploty, vlhké oblasti (16, 19)	0,8 – 1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	klíčenie brzdí tma (18, 19) teplá stratifikácia (1) žiadne osobitné postupy (5, 14, 22, 25, 26)	PO (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (lipkavec obyčajný)	A orná pôda, vlhké oblasti, narušené oblasti (16, 19)	7 – 9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	studená stratifikácia (1, 18, 19) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (18, 19) klíčenie brzdí svetlo (1) žiadne osobitné postupy (6, 14)	PRED a PO (6, 28)	A	32
Galium mollugo (lipkavec mäkký)	P okraje živých plotov, otvorené priestranstvá (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		žiadne osobitné postupy (5, 14, 22, 24, 26, 29)	PO (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (náprstník červený)	B, P živé ploty, otvorené priestranstvá (16, 19)	0,1 – 0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	klíčenie brzdí tma (1, 17 – 19) žiadne osobitné postupy (4, 22 – 26)	PO (4, 22 – 26)	D, G, F	

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť (1) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast (2)	Hĺbka sadenia (mm) (3)	Čas na klíčenie (počet dní) (4)	Osobitné postupy (5)	Test toxicity (6)	Dodávatelia osív (7)	Ďalšie odkazy (8)
Veronica persica (veronika perzská)	A orná pôda, otvorené priestranstvá, narušené oblasti (16, 19)	0,5 – 0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (19) 5 (96 %) (18)	klíčenie brzdí tma (18, 19) studená stratifikácia (18) žiadne osobitné postupy (14)	PRED a PO (28)	A	32

(1) A = jednoročné rastliny, B = dvojročné rastliny, P = trvalky.
(2) Odkazy 11, 14 a 33 sa týkajú pomeru svetla (L) a tmy (D) potrebného na vyvolanie klíčenia osiva. Odkazy 3, 6, 9, 10, 13, 20 sa týkajú podmienok pestovania v skleníkoch.
(3) Hodnota 0 mm označuje, že semená boli zasadené na povrchu pôdy alebo že semená potrebujú na klíčenie svetlo.
(4) Uvedené čísla predstavujú počet dní, v priebehu ktorých vyklíči dané percento semien podľa literatúry, napríklad tri dni, (50 %) vyklíčených semien, odkaz na literatúru (19).
(5) Trvanie dozrievania a/alebo stratifikácie nie je vždy k dispozícii. Okrem požiadaviek na studené ošetrenie, teplotné podmienky nie sú uvedené, keďže v rámci skleníkových testov je regulácia teploty obmedzená. Väčšina semien bude klíčiť za bežného kolísania teploty v skleníkoch.
(6) Označuje druhy rastlín, ktoré sa pred vyklíčením (PRED) a/alebo po vyklíčení (PO) používajú v rámci testu toxicity, zahŕňajúceho herbicídy.
(7) Poskytuje príklad/príklady obchodných dodávateľov osiva.
(8) Uvádza dva alternatívne odkazy na literatúru, ktorá sa použila.

Uvádzaní dodávatelia semien

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

UVÁDZANÁ LITERATÚRA

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

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

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

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

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

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

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

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

9. Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

10. Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC – Weeds. pp. 151 – 156.

11. Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)

12. Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

13. Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

14. Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

15. Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

16. Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

17. Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

18. Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

19. Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

20. Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453-459.

21. Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

22. Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

23. Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

24. Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

25. Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

26. Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

27. Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds. pp. 1021-1028.

28. McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

29. Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

30. USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

31. USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

32. Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

33. White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.

34. Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

Dodatok 4

Príklady vhodných rastových podmienok pre určité druhy plodín

Tieto podmienky sa považujú za vhodné pre desať druhov plodín a môžu sa použiť aj ako usmernenie pre testy v rastových komorách s určitými inými druhmi plodín:

koncentrácia oxidu uhličitého: 350 ppm ± 50 ppm,

relatívna vlhkosť: 70 % ± 5 % počas obdobia svetla a 90 % ± 5 % počas obdobia tmy,

teplota: 25 ± 3 °C počas dňa, 20 ± 3 °C počas noci,

fotoperióda: 16 hodín svetla/8 hodín tmy, za predpokladu priemernej vlnovej dĺžky v rozsahu 400 – 700 nm,

svetlo: svietivosť 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$, meraná vo vrchnej časti veka.

Druhy plodín:

— rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicon*),

— uhorka siata (*Cucumis sativus*),

— šalát hlávkový (*Lactuca sativa*),

— sója fazuľová (*Glycine max*),

— kapusta obyčajná hlávková (*Brassica oleracea var. capitata*),

— mrkva obyčajná (*Daucus carota*),

— ovos siaty (*Avena sativa*),

— mätonoh trváci (*Lolium perenne*),

— kukurica siata (*Zea mays*),

— cesnak cibuľový (*Allium cepa*).

C.32. **REPRODUKČNÝ TEST S ČERVAMI ČEĽADE *ENCHYTRAEIDAE***

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 220 (2004). Je určená na posúdenie účinkov chemikálií na reprodukčný výstup červov čeľade *Enchytraeidae* (*Enchytraeus albidus* Henle 1873) v pôde. Založená je predovšetkým na metóde, ktorú vyvinula Spolková agentúra pre životné prostredie (Umweltbundesamt) v Nemecku (1) a ktorá bola podrobená kruhovým testom (2). Do úvahy sa brali aj iné metódy testovania toxicity chemikálií pre červy čeľade *Enchytraeidae* a pre dážďovky (3) (4) (5) (6) (7) (8).

ÚVODNÉ ÚVAHY

2. Pôdne červy rodu *Enchytraeus* sú ekologicky vhodné druhy na ekotoxikologické testovanie. Aj keď červy čeľade *Enchytraeidae* sa často nachádzajú v pôdach obsahujúcich dážďovky, je tiež pravda, že často sú na ne bohaté aj mnohé pôdy, v ktorých sa dážďovky nevyskytujú. Červy čeľade *Enchytraeidae* je možné použiť pri laboratórnych testoch, ako aj v rámci polopoľných a poľných štúdií. Z praktického hľadiska sú mnohé druhy rodu *Enchytraeus* vhodné vzhľadom na jednoduchú manipuláciu a rozmnožovanie a na generačný čas, ktorý je omnoho kratší ako v prípade dážďoviek. Reprodukčný test s červami *Enchytraeidae* preto trvá iba štyri až šesť týždňov, zatiaľ čo s dážďovkami (*Eisenia fetida*) je to osem týždňov.

3. Základné informácie o ekológii a ekotoxikológii čeľade *Enchytraeidae* v suchozemskom životnom prostredí je možné nájsť v literatúre pod číslami (9), (10), (11), (12).

PRINCÍP TESTU

4. Dospelé červy *Enchytraeidae* sa vystavia účinkom rôznych koncentrácií testovanej chemikálie zamiešanej do umelo pripravenej pôdy. Test je možné rozdeliť na dve fázy: a) test na vyhľadávanie rozsahu v prípade, ak nie sú k dispozícii dostatočné informácie, v rámci ktorého je hlavným parametrom mortalita hodnotená po dvoch týždňoch expozície a b) konečný reprodukčný test, v rámci ktorého sa hodnotí celkový počet juvenilných jedincov vyprodukovaných rodičovským živočíchom a prežitie rodičovských živočíchov. Konečný test trvá šesť týždňov. Po prvých troch týždňoch sa dospelé červy odoberú a zaznamenajú sa morfologické zmeny. Po ďalších troch týždňoch sa spočíta potomstvo vyliahnuté z kokónov, ktoré vyprodukovali dospelé červy. Výstup reprodukcie živočíchov exponovaných testovanej chemikálii sa porovnáva s reprodukčným výstupom kontrolných vzoriek s cieľom stanoviť hodnoty i) koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC) a/alebo ii) koncentrácie EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) pomocou regresného modelu na odhad koncentrácie, ktorá by spôsobila zníženie reprodukčného výstupu o x %. Koncentrácia EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) by mala byť v rozsahu testovacích koncentrácií, aby sa potom hodnota EC_x určila interpoláciou namiesto extrapolácie.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

5. Predovšetkým by mala byť známa rozpustnosť vo vode, hodnota log K_{ow}, rozdeľovacia konštanta pôdnej vody (napr. kapitola C.18 alebo C.19 tejto prílohy) a tlak pary testovanej chemikálie. Žiaduce sú aj doplnkové informácie o osude testovanej chemikálie v pôde, napríklad rýchlosť fotolýzy a hydrolýzy.

6. Táto testovacia metóda sa môže použiť na chemikálie rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Spôsob aplikácie testovanej chemikálie sa však bude zodpovedajúcim spôsobom líšiť. Testovacia metóda nie je použiteľná v prípade prchavých chemikálií, t. j. chemikálií, pre ktoré je hodnota Henryho konštanty alebo rozdeľovacej konštanty vzduch/voda vyššia ako jeden, alebo chemikálií, pre ktoré tlak pár pri teplote 25 °C presahuje hodnotu 0,0133 Pa.

PLATNOSŤ TESTU

7. Na to, aby bol test platný, by kontrolné vzorky mali spĺňať tieto kritériá:

— mortalita dospelých jedincov by nemala presahovať hodnotu 20 % na konci testu na vyhľadávanie rozsahu a po prvých troch týždňoch reprodukčného testu,

— za predpokladu, že na začiatku testu bolo použitých 10 dospelých jedincov na nádobu, na konci testu by malo byť vyprodukovaných v priemere najmenej 25 juvenilných jedincov na nádobu,

— variačný koeficient okolo stredného počtu juvenilných jedincov na konci reprodukčného testu by nemal byť vyšší ako 50 %.

Ak test nespĺňa uvedené kritériá platnosti, jeho vykonávanie by sa malo ukončiť, pokiaľ nie je možné predložiť odôvodnenie pokračovania testu. Toto odôvodnenie by malo byť zahrnuté do správy o teste.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

8. Referenčná chemikália by sa mala testovať v pravidelných intervaloch alebo prípadne zahrnúť do každého testu s cieľom overiť, že reakcia testovaných organizmov sa postupom času výrazne nezmenila. Vhodnou referenčnou chemikáliou je karbendazim, pri ktorom sa preukázalo, že ovplyvňuje prežívanie a reprodukciu červov čeľade Enchytraeidae (13) (14), alebo by sa mohli používať aj iné chemikálie, ktorých údaje o toxicite sú dobre známe. V kruhovom teste (2) sa použil karbendazim vo forme prípravku známeho pod obchodným názvom Derosal™, ktorý dodáva spoločnosť AgrEvo (Frankfurt, Nemecko) a ktorý obsahuje 360 g/l (32,18 %) účinnej zložky. Koncentrácia EC_{50} pre reprodukciu stanovená v rámci kruhového testu dosahovala hodnoty v rozsahu 1,2 mg ± 0,8 mg účinnej zložky/kg suchej hmotnosti (2). Ak sa do série testov zahrnie pozitívny štandard toxicity, použije sa jedna koncentrácia a počet replikátov by mal byť rovnaký ako pri kontrolných vzorkách. V prípade karbendazimu sa na testovanie odporúča 1,2 mg účinnej zložky/kg suchej hmotnosti (testuje sa ako kvapalný prípravok).

OPIS TESTU

Zariadenia

9. Testovacie nádoby by mali byť vyrobené zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu. Vhodné sú sklené poháre (napr. s objemom 0,2 – 0,25 litra a priemerom ≈ 6 cm). Nádoby by mali mať priesvitné veká (napr. zo skla alebo polyetylénu) navrhnuté tak, aby znížili vyparovanie vody, ale zároveň umožnili výmenu plynov medzi pôdou a atmosférou. Veká by mala byť priesvitné, aby umožňovali prechod svetla.

10. Potrebné je bežné laboratórne vybavenie, konkrétne toto:

— skrinka na sušenie,

— stereomikroskop,

— pH-meter a fotometer,

— vhodné presné váhy,

— primerané zariadenie na regulovanie teploty,

— primerané zariadenie na regulovanie vlhkosti (nie je to nevyhnutné, ak nádoby s exponovanými vzorkami majú veká),

— inkubátor alebo malá miestnosť s klimatizačným zariadením,

— pinzety, háčiky alebo slučky,

— fotografická miska.

Príprava umelej pôdy

11. V tomto teste sa používa umelo prirpavená pôda (5) (7) s týmto zložením (na základe sušiny vysušenej na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C):

— 10 % rašeliny, vysušenej vzduchom a jemne drvenej (prijateľné sú častice veľkosti 2 mm ± 1 mm); odporúča sa pred použitím na test skontrolovať, či je pôda pripravená s čerstvou dávkou rašeliny vhodná na kultiváciu červov,

— 20 % kaolínovej hliny (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %),

— približne 0,3 – 1 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, práškový, analytickej čistoty) na dosiahnutie hodnoty pH 6,0 ± 0,5; pridávané množstvo uhličitanu vápenatého môže do značnej miery závisieť od kvality/vlastností rašeliny,

— približne 70 % vzduchom vysušeného kremenného piesku (v závislosti od potrebného množstva $CaCO_3$), prevažne jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 mikrónov.

Odporúča sa pred použitím na konečný test preukázať vhodnosť umelej pôdy na kultiváciu červov a na splnenie kritérií platnosti testu. Osobitne sa odporúča, aby sa takouto kontrolou zabezpečilo, že priebeh testu nebude ohrozený, ak obsah organického uhlíka v umelej pôde klesne, napríklad znížením obsahu rašeliny na 4 – 5 % a zodpovedajúcim zvýšením obsahu piesku. V dôsledku takéhoto poklesu obsahu organického uhlíka sa môžu znížiť možnosti adsorpcie testovanej chemikálie na pôdu (organický uhlík) a dostupnosť testovanej chemikálie pre červy sa môže zvýšiť. Preukázalo sa, že červy druhu *Enchytraeus albidus* môžu splniť kritériá platnosti, pokiaľ ide o reprodukciu, keď sa testy vykonávajú v poľných pôdach s nižším obsahom organického uhlíka, než bolo uvedené (napr. 2,7 %) (15), a existujú skúsenosti, hoci obmedzené, že toto je možné dosiahnuť aj v umelo pripravenej pôde s 5 % rašeliny.

Poznámka: Vhodnosť pôdy a splnenie kritérií platnosti testu by sa mali preukázať aj v prípade použitia prírodnej pôdy v ďalšom testovaní (napr. vyššieho stupňa).

12. Suché zložky pôdy sa dôkladne zmiešajú (napr. vo veľkokapacitnom laboratórnom miešači). Malo by sa tak urobiť prinajmenšom týždeň pred začiatkom testu. Zmiešaná pôda by sa mala skladovať dva dni, aby sa vyvážila/stabilizovala jej kyslosť. Na stanovenie pH sa používa zmes pôdy a roztoku 1 M chloridu draselného (KCl) alebo 0,01 M chloridu vápenatého ($CaCl_2$) v pomere 1: 5 (pozri literatúru (16) a dodatok 3). Ak je pôda kyslejšia než požadovaný rozsah (pozri bod 11), môže sa upraviť pridaním príslušného množstva $CaCO_3$. Ak je pôda príliš alkalická, môže sa upraviť pridaním väčšieho množstva zmesi, uvedenej v bode 11, ale s vylúčením $CaCO_3$.

13. Maximálna kapacita zadržiavania vody umelej pôdy sa stanoví v súlade s postupmi opísanými v dodatku 2. Jeden alebo dva dni pred začiatkom testu sa suchá umelá pôda predvlhčí pridaním dostatočného množstva deionizovanej vody, aby sa dosiahla približne polovica konečného obsahu vody, čo je 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody. Na začiatku testu sa predvlhčená pôda rozdelí na časti zodpovedajúce počtu testovacích koncentrácií (a v prípade potreby počtu vzoriek referenčnej chemikálie) a kontrolných vzoriek používaných na test. Obsah vlhkosti sa upraví na 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody pridaním roztoku testovanej chemikálie a/alebo pridaním destilovanej alebo deionizovanej vody (pozri body 19 – 21). Obsah vlhkosti sa stanoví na začiatku a na konci testu (vysušením na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C) a jeho hodnota by mala byť v optimálnom rozsahu pre prežitie červov. Hrubú kontrolu obsahu vlhkosti v pôde je možné vykonať jemným stláčaním pôdy v ruke. Ak je obsah vlhkosti správny, medzi prstami by sa mali objaviť malé kvapky vody.

Výber a príprava testovacích živočíchov

14. Odporúčaný testovací druh je *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (mrlica biela), patriaci do čeľade *Enchytraeidae* (trieda *Oligochaeta*, kmeň *Annelida*). *E. albidus* je jeden z najväčších druhov čeľade *Enchytraeidae*, so zaznamenanými exemplármi dĺžky až 35 mm (17) (18). *E. albidus* sa vyskytuje na celom svete v morských, sladkovodných a suchozemských biotopoch, najmä v rozkladajúcej sa organickej hmote (morské riasy, kompost) a iba zriedka na lúkach (9). Jeho široká ekologická tolerancia a niektoré morfologické odchýlky by mohli poukazovať na existenciu viacerých línií.

15. *E. albidus* je komerčne dostupný ako krmivo pre ryby. Je potrebné skontrolovať, či kultúra nie je kontaminovaná inými, zvyčajne menšími druhmi (1) (19). Ak sa zistí kontaminácia, všetky červy by sa mali premyť vodou v Petriho miske. Potom by sa mali vybrať (pomocou stereomikroskopu) veľké dospelé exempláre *E. albidus* s cieľom začať novú kultúru, pričom všetky ostatné červy sa odstránia. *E. albidus* je možné jednoducho pestovať v širokej škále organických materiálov (pozri dodatok 4). Životný cyklus *E. albidus* je krátky, keďže dospievanie červa trvá od 33 dní (pri teplote 18 °C) do 74 dní (pri teplote 12 °C) (1). Na test sa použijú iba kultúry, ktoré sa bez problémov udržiavali v laboratóriu najmenej päť týždňov (jedna generácia).

16. Iné druhy rodu *Enchytraeus* sú tiež vhodné, napríklad *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 alebo *E. crypticus* Westheide a Graefe 1992 (pozri dodatok 5). Ak sa použijú iné druhy rodu *Enchytraeus*, musia byť jednoznačne identifikované a do správy by sa malo uviesť odôvodnenie výberu daného druhu.

17. Živočíchy použité na testy sú dospelé červy. Mali by mať vajíčka (biele škvrny) v oblasti klitella a mali by byť približne rovnakej veľkosti (asi 1 cm dlhé). Synchronizácia chovu kultúry nie je potrebná.

18. Ak sa červy nechovajú v tom istom druhu pôdy a za podmienok (vrátane kŕmenia) používaných pre záverečný test, musia sa aklimatizovať najmenej 24 hodín, prípadne až tri dni. Spočiatku by sa mal aklimatizovať väčší počet dospelých jedincov, než je potrebný na vykonanie testu, aby bol priestor na zamietnutie poškodených alebo inak nevhodných exemplárov. Na konci obdobia aklimatizácie sa na testy vyberú len červy, ktoré obsahujú vajíčka a nevykazujú žiadne poruchy správania (napr. pokusy uniknúť z pôdy). Červy sa opatrne vyberú pomocou klenotníckych pinziet, háčikov alebo slučiek a umiestnia sa do Petriho misky obsahujúcej malé množstvo sladkej vody. Na tento účel sa uprednostňuje rekonštituovaná sladká voda, ako sa navrhuje v kapitole C.20 tejto prílohy (reprodukčný test na *Daphnia magna*), keďže deionizovaná voda, demineralizovaná voda alebo voda z vodovodu by mohla byť pre červov škodlivá. Červy sa kontrolujú pod stereomikroskopom a každý, ktorý neobsahuje vajíčka, sa vyradí. Dbá sa na vybratie a odstránenie všetkých roztočov alebo chvostoskokov, ktoré môžu infikovať kultúry. Zdravé červy, ktoré sa nepoužijú na test, sa vrátia do zásobnej kultúry.

Príprava testovacích koncentrácií

Testovaná chemikália rozpustná vo vode

19. Roztok testovanej chemikálie sa pripravuje s deionizovanou vodou v množstve dostatočnom pre všetky replikáty jednej testovacej koncentrácie. Odporúča sa použitie primeraného množstva vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti, t. j. 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody (pozri bod 13). Každý roztok testovanej chemikálie sa pred vložením do testovacej nádoby dôkladne premieša s jednou šaržou predvlhčenej pôdy.

Testovaná chemikália nerozpustná vo vode

20. V prípade chemikálií nerozpustných vo vode, ale rozpustných v organických rozpúšťadlách, sa testovaná chemikália môže rozpustiť v čo najmenšom objeme vhodného nosiča (napr. acetónu). Používať by sa mali iba prchavé rozpúšťadlá. Nosič sa nastrieka na malé množstvo, napríklad 2,5 g, jemného kremenného piesku, alebo sa s ním zmieša. Nosič sa odstráni najmenej hodinovým odparovaním pod digestorom. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do predvlhčenej pôdy a po pridaní primeraného množstva deionizovanej vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti, sa dôkladne premieša. Konečná zmes sa vloží do testovacích nádob.

21. V prípade chemikálií, ktoré sú slabo rozpustné vo vode a v organických rozpúšťadlách, sa ekvivalent 2,5 g jemne drveného kremenného piesku na testovaciu nádobu zmieša s príslušným množstvom testovanej chemikálie na dosiahnutie požadovanej testovacej koncentrácie. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do predvlhčenej pôdy a dôkladne zmieša s primeraným množstvom deionizovanej vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti. Konečná zmes sa rozdelí medzi testovacie nádoby. Tento postup sa opakuje pre každú testovaciu koncentráciu a pripravia sa aj primerané kontrolné vzorky.

22. Chemikálie by sa spravidla nemali testovať pri koncentráciách vyšších ako 1 000 mg/kg suchej hmotnosti pôdy. Testovanie pri vyšších koncentráciách sa však môže vyžadovať v súlade s cieľmi osobitného testu.

VYKONANIE TESTOV

Testovacie skupiny a kontrolné vzorky

23. Pre každú testovaciu koncentráciu sa množstvo testovacej pôdy zodpovedajúce 20 g sušiny umiestni do testovacej nádoby (pozri body 19 – 21). Pripravia sa tiež kontrolné vzorky bez testovanej chemikálie. Do každej nádoby sa pridá potrava v súlade s postupmi opísanými v bode 29. Do každej testovacej nádoby sa

náhodným výberom umiestni desať červov. Červy sa opatrne prenesú do každej testovacej nádoby a umiestnia na povrch pôdy, napríklad pomocou klenotníckych pinziet, háčikov alebo slučiek. Počet replikátov pre testovacie koncentrácie a kontrolné vzorky závisí od použitej koncepcie testu (pozri bod 34). Testovacie nádoby sa náhodne umiestnia v testovacom inkubátore a tieto pozície sa raz týždenne náhodne zmenia.

24. Ak sa na aplikáciu testovanej chemikálie použije nosič, mala by sa okrem testovacej série pripraviť jedna kontrolná séria obsahujúca kremenný piesok s nastriekaným alebo zamiešaným rozpúšťadlom. Koncentrácia rozpúšťadla alebo dispergantu by mala byť rovnaká, aká sa používa v testovacích nádobách obsahujúcich testovanú chemikáliu. V prípade chemikálií, ktoré si vyžadujú aplikáciu v súlade s postupmi uvedenými v bode 21, by sa mala pripraviť kontrolná séria obsahujúca doplnkový kremenný piesok (2,5 g na nádobu).

Podmienky testu

25. Testovacia teplota je 20 °C ± 2 °C. S cieľom zabrániť úniku červov z pôdy sa test vykonáva v kontrolovaných cykloch svetla a tmy (podľa možnosti 16 hodín svetla a 8 hodín tmy) s intenzitou osvetlenia 400 až 800 luxov v okolí testovacích nádob.

26. S cieľom kontrolovať vlhkosť pôdy sa nádoby odvážia na začiatku testu a potom raz týždenne. Úbytok hmotnosti sa dopĺňa pridaním primeraného množstva deionizovanej vody. Je potrebné si uvedomiť, že strata vody sa môže znížiť udržiavaním vysokej vlhkosti vzduchu (> 80 %) v testovacom inkubátore.

27. Obsah vlhkosti a hodnota pH by sa mali merať na začiatku a na konci testu na vyhľadávanie rozsahu aj konečného testu. Merania by sa mali robiť v kontrolných vzorkách pôdy, ako aj vo vzorkách s aplikovanou chemikáliou (všetky koncentrácie), ktoré boli pripravené a udržiavané rovnakým spôsobom ako testovacie kultúry, ale bez červov. Potrava by sa mala pridávať do vzoriek pôdy len na začiatku testu na uľahčenie mikrobiálnej aktivity. Množstvo pridanej potravy by malo byť rovnaké, aké sa pridáva do testovaných kultúr. Počas testu nie je potrebné pridávať do týchto nádob ďalšiu potravu.

Kŕmenie

28. Používať sa môže potrava, ktorá je schopná udržiavať populáciu červov čeľade *Enchytraeidae*. Zistilo sa, že vhodným kŕmnym materiálom sú ovsené otruby, ktoré sa podľa možnosti pred použitím autoklávujú, aby sa predišlo mikrobiálnej kontaminácii (vhodné je aj zohrievanie).

29. Potrava sa najskôr pripraví zmiešaním 50 mg mletých ovsených otrúb s pôdou v každej nádobe pred vložením červov. Potom sa potrava dodáva týždenne, až do 21. dňa. Kŕmenie sa nevykoná v 28. deň, keďže dospelé jedince boli v tejto fáze premiestnené a mladé červy odvtedy potrebujú pomerne málo doplnkovej potravy. Kŕmenie počas testu pozostáva z 25 mg mletých ovsených otrúb na nádobu, ktoré sa opatrne uložia na povrch pôdy tak, aby sa predišlo poraneniu červov. V záujme obmedzenia tvorby plesní by sa uložené ovsené vločky mali prekryť malým množstvom pôdy. Ak potrava zostáva neskonzumovaná, dávka by sa mala znížiť.

Koncepcia testu na vyhľadávanie rozsahu

30. V prípade potreby sa vykoná test na vyhľadávanie rozsahu, napríklad s piatimi koncentráciami testovanej chemikálie: 0,1, 1,0, 10, 100 a 1 000 mg/kg (suchej hmotnosti pôdy). Postačuje jeden replikát pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú vzorku.

31. Test na vyhľadávanie rozsahu trvá dva týždne. Na konci testu sa posudzuje mortalita červov. Červ sa považuje za mŕtveho, keď nereaguje na mechanický podnet v prednej časti tela. Doplnkové informácie o mortalite môžu byť užitočné aj pri rozhodovaní o rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú v konečnom teste. Preto by sa mali zaznamenať aj zmeny v správaní (napr. neschopnosť zavŕtať sa do pôdy, ležanie bez pohybu pri sklenej stene testovacej nádoby) a morfológii (napr. prítomnosť otvorených rán) dospelých jedincov, ako aj existencia každého juvenilného jedinca. Prírastok juvenilných jedincov je možné určovať pomocou metódy farebného označovania opísanej v dodatku 6.

32. Hodnotu koncentrácie LC_{50} je možné približne určiť výpočtom geometrickej strednej hodnoty údajov o mortalite. Pri stanovení koncentračného rozsahu pre konečný test sa predpokladá, že účinky na reprodukciu sú nižšie ako hodnota LC_{50}, s faktorom až do 10. To je však empirický vzťah a v každom konkrétnom prípade môže byť iný. Ďalšie pozorovania v rámci testu na vyhľadávanie rozsahu, ako je výskyt juvenilných jedincov, môžu pomôcť spresniť rozsah koncentrácie testovanej chemikálie, ktorý sa použije pri konečnom teste.

33. Na presné stanovenie hodnoty LC_{50} sa odporúča vykonanie testu s použitím najmenej štyroch replikátov každej koncentrácie testovanej chemikálie a primeraným počtom koncentrácií, ktoré vyvolajú aspoň štyri odlišné štatisticky významné stredné reakcie na tieto koncentrácie. V prípade potreby sa používa podobný počet koncentrácií a replikátov pre kontrolné vzorky.

Koncepcia konečného reprodukčného testu

34. Na základe odporúčaní vyplývajúcich z kruhového testu sa navrhujú tri koncepcie (2):

— Na stanovenie hodnoty NOEC by sa malo testovať aspoň päť koncentrácií v geometrickej sérii. Odporúčajú sa štyri replikáty pre každú testovaciu koncentráciu a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 1,8.

— Na stanovenie hodnoty EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) by sa malo testovať aspoň päť koncentrácií, pričom hodnota EC_x by mala byť v rozsahu týchto koncentrácií, aby sa mohla určiť interpoláciou namiesto extrapolácie. Odporúčajú sa najmenej štyri replikáty pre každú testovaciu koncentráciu a štyri kontrolné replikáty. Faktor rozstupu sa môže meniť, t. j. môže mať hodnotu najviac 1,8 v očakávanom rozsahu účinkov a viac ako 1,8 pri vyšších a nižších koncentráciách.

— Kombinovaný prístup umožňuje určenie obidvoch koncentrácií, NOEC aj EC_x. Použiť by sa malo osem koncentrácií aplikovanej chemikálie v geometrickom rade. Odporúčajú sa štyri replikáty pre každú aplikáciu chemikálie a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 1,8.

35. Použiť by sa malo desať dospelých červov na testovaciu nádobu (pozri bod 23). Potrava sa pridáva do testovacích nádob na začiatku testu a potom raz týždenne (pozri bod 29), až do 21. dňa vrátane. V 21. deň sa vzorky pôdy pozorne ručne prehľadajú, nájdu a spočítajú sa žijúce dospelé červy a zaznamenajú sa zmeny v ich správaní (napr. neschopnosť zavŕtať sa do pôdy, ležanie bez pohybu pri sklenej stene testovacej nádoby) a morfológii (napr. otvorené rany). Všetky dospelé červy sa potom vyberú z testovacích nádob a testovacej pôdy. Testovacia pôda, ktorá obsahuje akékoľvek vzniknuté kokóny, sa inkubuje ďalšie tri týždne za tých istých podmienok testu, s výnimkou toho, že kŕmenie sa vykonáva len v 35. deň (25 mg mletých ovsených vločiek na nádobu).

36. Po šiestich týždňoch sa počítajú čerstvo vyliahnuté červy. Odporúča sa metóda založená na farebnom označovaní bengálskym červeným farbivom (pozri dodatok 6), hoci aj iné mokré (ale nie tepelné) techniky extrakcie a vyplavovania (pozri dodatok 6) sa ukázali ako vhodné (4) (10) (11) (20). Farebné označovanie bengálskou červeňou sa odporúča, lebo mokrej extrakcii z pôdneho substrátu môže brániť turbidite spôsobenej suspendovanými časticami ílu.

Limitný test

37. Ak sa v rámci testu na vyhľadávanie rozsahu nepozorujú žiadne účinky ani pri najvyššej koncentrácii (t. j. 1 000 mg/kg), reprodukčný test sa môže vykonať ako limitný test s použitím koncentrácie 1 000 mg/kg s cieľom dokázať, že hodnota NOEC z hľadiska reprodukcie je vyššia ako uvedená hodnota.

Zhrnutie a harmonogram testu

38. Jednotlivé kroky testu je možné zhrnúť takto:

Čas	Test na vyhľadávanie rozsahu	Konečný test
–7. deň alebo skôr	— príprava umelej pôdy (miešanie suchých zložiek)	— príprava umelej pôdy (miešanie suchých zložiek)
–5. deň	— kontrola pH umelej pôdy — meranie maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde	— kontrola pH umelej pôdy — meranie maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde
–5. deň až –3. deň	— roztriedenie červov na aklimatizáciu	— roztriedenie červov na aklimatizáciu
– 3. až 0. deň	— aklimatizácia červov najmenej 24 hodín	— aklimatizácia červov najmenej 24 hodín
–1. deň	— predvlhčenie umelo pripravenej pôdy a rozdelenie do dávok	— predvlhčenie umelo pripravenej pôdy a rozdelenie do dávok
0. deň	— príprava zásobných roztokov — aplikácia testovanej chemikálie — váženie testovacieho substrátu do testovacích nádob — zamiešanie potravy — vloženie červov — meranie pH pôdy a obsahu vlhkosti v pôde	— príprava zásobných roztokov — aplikácia testovanej chemikálie — váženie testovacieho substrátu do testovacích nádob — zamiešanie potravy — vloženie červov — meranie pH pôdy a obsahu vlhkosti v pôde
7. deň	— kontrola vlhkosti pôdy	— kontrola vlhkosti pôdy — kŕmenie
14. deň	— stanovenie mortality dospelých jedincov — odhad počtu juvenilných jedincov — meranie pH pôdy a obsahu vlhkosti v pôde	— kontrola vlhkosti pôdy — kŕmenie
21. deň		— pozorovanie správania dospelých jedincov — premiestnenie dospelých jedincov — stanovenie mortality dospelých jedincov — kontrola vlhkosti pôdy — kŕmenie
28. deň		— kontrola vlhkosti pôdy — bez kŕmenia

Čas	Test na vyhľadávanie rozsahu	Konečný test
35. deň		— kontrola vlhkosti pôdy — kŕmenie
42. deň		— počítanie juvenilných červov — meranie pH pôdy a obsahu vlhkosti v pôde

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

39. Hoci v dodatku 7 je uvedený prehľad, žiadne definitívne štatistické usmernenia na analýzu výsledkov testu táto testovacia metóda neposkytuje.

40. V rámci testu na vyhľadávanie rozsahu je hlavným parametrom mortalita. Preto by sa mali zaznamenať aj zmeny v správaní (napr. neschopnosť zavŕtať sa do pôdy, ležanie bez pohybu pri sklenej stene testovacej nádoby) a morfológii (napr. prítomnosť otvorených rán) dospelých jedincov, ako aj existencia každého juvenilného jedinca. Na stanovenie koncentrácie LC_{50} by sa mala spravidla používať probitová analýza (21) alebo logaritmická regresia. Napriek tomu v prípadoch, keď je táto metóda analýzy nevhodná (napr. ak sú k dispozícii menej ako tri koncentrácie čiastočne spôsobujúce usmrtenie), je možné použiť alternatívne metódy. Tieto metódy môžu zahŕňať pohyblivé priemery (22), upravenú Spearman-Karberovu metódu (23) alebo jednoduchú interpoláciu (napr. geometrickú strednú hodnotu LC_0 a LC_{100}, vypočítanú ako súčin druhej odmocniny LC_0 a hodnoty LC_{100}).

41. V rámci konečného testu je hlavným parametrom plodnosť (t. j. počet narodených juvenilných jedincov). Pokiaľ však ide o test na vyhľadávanie rozsahu, všetky ostatné škodlivé príznaky by sa mali uviesť v záverečnej správe. Štatistická analýza si vyžaduje výpočet aritmetickej strednej hodnoty a štandardnej odchýlky vo vzťahu k reprodukcii pre vzorky s aplikovanou chemikáliou a kontrolné vzorky.

42. Ak sa vykonáva analýza variancie, štandardnú odchýlku (s) a stupne voľnosti (df) môže nahradiť odhad výberovej variancie, získaný postupom ANOVA, a jej stupne voľnosti, za predpokladu, že variancia nezávisí od koncentrácie. V tomto prípade sa použije jedna hodnota variancií pre kontrolné vzorky a pre vzorky s aplikovanou chemikáliou. Tieto hodnoty sa zvyčajne vypočítajú pomocou komerčného štatistického softvéru s využitím výsledkov pre jednotlivé nádoby ako replikátov. Ak sa spájanie údajov pre negatívne kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom zdá byť primeranejšie než porovnávanie s jednou z týchto skupín v rámci testu, malo by sa testovaním zistiť, či nie sú výrazne odlišné (vhodné testy sú uvedené v bode 45 a dodatku 7).

43. Ďalšie štatistické testovanie a odvodzovanie závisí od toho, či majú hodnoty pre replikáty normálne rozdelenie a sú homogénne, pokiaľ ide o ich varianciu.

Odhad koncentrácie NOEC

44. Uprednostniť by sa malo použitie výkonných testov. Mali by sa využívať informácie napríklad z predchádzajúcich skúseností s kruhovým testovaním alebo iné historické údaje o tom, či sú údaje približne normálne rozdelené. Homogénnosť variancie (homoskedasticita) je kritickejšia. Zo skúseností vyplýva, že variancia sa často zvyšuje s rastúcou strednou hodnotou. V týchto prípadoch by transformácia údajov mohla viesť k homoskedasticite. Taká transformácia by však mala byť založená na skúsenostiach s historickými údajmi, a nie na údajoch, ktoré sú predmetom prešetrovania. S homogénnymi údajmi by sa mali vykonať viaceré t-testy, ako napríklad Williamsov test (α = 0,05, jednostranný) (24) (25), alebo v určitých prípadoch Dunnettov test (26) (27). Je potrebné si uvedomiť, že v prípade nerovnakej replikácie sa tabuľkové t-hodnoty musia upraviť, ako navrhujú Dunnett a Williams. Niekedy sa reakcie nezvyšujú/neznižujú pravidelne v dôsledku veľkých odchýlok. V prípade výraznej odchýlky od monotónnosti je Dunnettov test vhodnejší. Ak sa vyskytujú odchýlky od homoskedasticity, môže byť vhodné podrobnejšie preskúmať možné účinky na variancie s cieľom rozhodnúť,

či sa t-testy môžu použiť bez výraznejšej straty výkonnosti (28). Alternatívne sa môžu použiť viacnásobné U-testy, napríklad Bonferroniho U-test podľa Holma (29), alebo v prípade, keď tieto údaje vykazujú heteroscedasticitu, ale inak sú v súlade so základným monotónnym priebehom krivky závislosti dávka-odpoveď, môže sa použiť iný neparametrický test [napr. Jonckheereho-Terpstrov (30) (31) alebo Shirleyho (32) (33)], pričom vo všeobecnosti sú tieto testy uprednostňované pred t-testami s nerovnakou varianciou (pozri tiež náčrt v dodatku 7).

45. Ak sa vykonáva limitný test a sú splnené podmienky postupov parametrického testu (normalita, homogenita), môže sa použiť Studentov párový t-test, alebo inak Mannov-Whitneyho postup U-testu (29).

Odhad koncentrácie EC_x

46. Pri výpočte ktorejkoľvek hodnoty EC_x sa na regresnú analýzu (lineárnu alebo nelineárnu) používajú stredné hodnoty pre jednotlivé vzorky s aplikovanou chemikáliou, a to po získaní vhodnej funkcie závislosti dávky a reakcie. Pre rast červov ako nepretržitú reakciu sa hodnoty EC_x môžu odhadnúť použitím vhodnej regresnej analýzy (35). Medzi vhodné funkcie pre kvantálne údaje (mortalita/prežitie a počet vyprodukovaných potomkov) patria bežný sigmoid, logistická alebo Weibullova funkcia s dvomi až štyrmi parametrami, pričom niektoré z týchto funkcií môžu modelovať aj hormetické reakcie. Ak sa lineárnou regresnou analýzou určila funkcia závislosti dávky a reakcie, mal by sa pred odhadom hodnoty EC_x nájsť regresnou analýzou významný koeficient determinácie (r^2) a/alebo sklon zadaním hodnoty zodpovedajúcej x % strednej hodnoty pre kontrolnú vzorku do rovnice získanej regresnou analýzou. Hranice spoľahlivosti 95 % sa vypočítajú podľa Fiellera [citovaný v práci Finneyho (21)] alebo inými modernými vhodnými metódami.

47. Alternatívne sa reakcia modeluje ako percentuálna časť alebo podiel modelového parametra, ktorý sa interpretuje ako stredná hodnota reakcie kontrolnej vzorky. V týchto prípadoch sa výsledky často môžu ľahko znázorniť normálnou (logistickou, Weibullovou) sigmoidnou krivkou s použitím postupu probitovej regresie (21). V týchto prípadoch sa váhová funkcia musí upraviť na metrické reakcie, ako uvádza Christensen (36). Ak sa však pozoruje horméza, probitovú analýzu by mala nahradiť logistická alebo Weibullova funkcia so štyrmi parametrami, určená postupom nelineárnej regresie (36). Ak z údajov nie je možné určiť vhodnú funkciu závislosti dávky a reakcie, môžu sa na odhad hodnoty EC_x a jej hraníc spoľahlivosti použiť alternatívne metódy, ako sú pohyblivé priemery podľa Thompsona (22) a upravený Spearman-Karberov postup (23).

PROTOKOL O SKÚŠKE

48. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, a ak je to relevantné, fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. rozpustnosť vo vode, tlak pary),

— chemická identifikácia testovanej chemikálie podľa názvoslovia IUPAC, číslo CAS, číslo šarže, dávky, štrukturálny vzorec a čistota,

— dátum expirácie vzorky.

Testované druhy:

— použité testované živočíchy: druh, vedecký názov, zdroj organizmov a podmienky chovu,

Podmienky testu:

— zložky a príprava umelej pôdy,

— metóda aplikácie testovanej chemikálie,

— opis testovacích podmienok vrátane teploty, obsahu vlhkosti, pH atď.,

— úplný opis koncepcie experimentu a postupov.

Výsledky testu:

— mortalita dospelých červov po dvoch týždňoch a počet juvenilných jedincov na konci testu na vyhľadávanie rozsahu,

— mortalita dospelých červov po troch týždňoch expozície a celý záznam o juvenilných jedincoch na konci konečného testu,

— akékoľvek pozorované fyzikálne alebo patologické príznaky a zmeny v správaní testovaných organizmov,

— hodnoty LC_{50}, NOEC a/alebo EC_x (napr. EC_{50}, EC_{10}) pre reprodukciu, ak sú niektoré z nich použiteľné, spolu s intervalmi spoľahlivosti a grafom, ktorý znázorňuje model ich výpočtu, ako aj všetky informácie a pozorovania, ktoré môžu byť nápomocné pri interpretácii výsledkov,

Uvedú sa odchýlky od postupov opísaných v tejto testovacej metóde a všetky nezvyčajné udalosti počas testu.

LITERATÚRA

1. Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

2. Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.

3. Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,

4. Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

5. Chapter C.8 of this Annex, Toxicity for Earthworms.

6. ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

7. ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

8. Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.

9. Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.

10. Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

11. Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

12. Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.

13. Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

14. Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

15. Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

16. ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

17. Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

18. Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

19. Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.

20. Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

21. Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

22. Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

23. Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

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

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

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

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

28. Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

29. Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

30. Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

31. Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

32. Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

33. Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

34. Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

35. Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

36. Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov:

Chemikália je látka alebo zmes.

EC_x (účinná koncentrácia x %) je koncentrácia, ktorá v rámci stanoveného času expozície vyvolá účinok x % na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou vzorkou. V rámci tohto testu sa účinné koncentrácie vyjadrujú ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy.

LC_0 (nulová letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku nespôsobí usmrtenie testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC_0 vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovanej pôdy.

LC_{50} (stredná letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku spôsobí usmrtenie 50 % testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC_{50} vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovanej pôdy.

LC_{100} (absolútna letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku spôsobí usmrtenie 100 % testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC_{100} vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovanej pôdy.

LOEC (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom) je najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá má štatisticky významný účinok ($p < 0,05$). V rámci tohto testu sa LOEC vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy. Všetky testovacie koncentrácie vyššie ako LOEC by za normálnych okolností mali vyvolať účinok, ktorý je štatisticky odlišný od kontrolných vzoriek. Akékoľvek odchýlky od uvedeného pri určovaní LOEC musia byť odôvodnené v správe o teste.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie, bezprostredne pod koncentráciou LOEC, pri ktorej sa nepozoruje žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného expozičného času v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Miera reprodukcie je stredná hodnota počtu narodených juvenilných červov na počet dospelých červov počas testu.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Dodatok 2

Stanovenie maximálnej kapacity zadržiavania vody

Stanovenie kapacity zadržiavania vody umelej pôdy

Táto metóda sa považuje za vhodnú. Opísaná je v prílohe C normy ISO DIS 11268-2.

Pomocou vhodného zariadenia (špirálová trubica atď.) sa odoberie určené množstvo (napr. 5 g) testovacieho pôdneho substrátu. Spodná časť trubice sa zakryje kúskom filtračného papiera a po naplnení vodou sa umiestni na stojan vo vodnom kúpeli. Trubica by sa mala postupne ponárať do vody, až kým vodná hladina nestúpne nad vrchnú vrstvu pôdy. Potom by sa mala nechať vo vode približne tri hodiny. Keďže nie všetka voda, ktorú absorbujú kapiláry pôdy, sa môže zachovať, vzorke pôdy by sa malo umožniť odvodnenie počas dvoch hodín tak, že sa trubica uloží na vrstvu veľmi mokrého jemne drveného kremenného piesku v uzavretej nádobe (aby sa zabránilo vysúšaniu). Vzorka by sa potom mala odvážiť a vysušiť na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kapacitu zadržiavania vody (WHC) je možné vypočítať takto:

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

kde:

S = vodou saturovaný substrát + hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera,

T = hmotnosť obalu (hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera),

D = suchá hmotnosť substrátu.

LITERATÚRA:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

Dodatok 3

Stanovenie ph pôdy

Táto metóda stanovenia pH vzorky pôdy je založená na opise uvedenom v norme ISO 10390 (Kvalita pôdy – stanovenie pH).

Určené množstvo pôdy sa suší pri teplote miestnosti najmenej 12 hodín. Potom sa vytvorí suspenzia pôdy (obsahujúca najmenej 5 g pôdy) s päťnásobným objemom 1 M chloridu draselného (KCl) analytickej čistoty alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) analytickej čistoty. Suspenzia sa potom päť minút dôkladne pretrepáva. Po pretrepaní sa suspenzia nechá stáť najmenej 2 hodiny, ale nie dlhšie ako 24 hodín. Hodnota pH kvapalnej fázy sa potom meria pH-metrom, ktorý sa pred každým meraním kalibruje pomocou vhodnej série tlmivých roztokov (napr. s pH 4,0 a 7,0).

LITERATÚRA:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

Dodatok 4

Kultivačné podmienky rodu *Enchytraeus*

Červy druhu *Enchytraeus albidus* (ako aj iné druhy rodu *Enchytraeus*) z čeľade *Enchytraeidae* je možné kultivovať vo veľkých plastových boxoch (napr. s rozmermi 30 × 60 × 10 cm) naplnených zmesou 1:1 umelo pripravenej pôdy a prírodnej nekontaminovanej záhradnej pôdy. Kompostový materiál sa nesmie používať, lebo by mohol obsahovať toxické chemikálie, ako sú ťažké kovy. Faunu je potrebné z pôdy pred použitím odstrániť (napr. hlbokým zmrazením). Použiť sa môže aj substrát tvorený len umelou pôdou, ale miera reprodukcie môže byť nižšia, než sa dosiahne pomocou zmiešaného pôdneho substrátu. Substrát, ktorý sa používa na kultiváciu, by mal mať hodnotu pH 6,0 ± 0,5.

Kultúra sa uchováva v tme pri teplote 15 – 20 °C ± 2 °C. Je potrebné zabrániť stúpnutiu teploty nad 23 °C. Pôda sa musí udržiavať vlhká, ale nie mokrá. Správny obsah vlhkosti v pôde sa prejaví malými kvapkami vody medzi prstami pri jemnom stláčaní pôdy. Musí sa predchádzať vzniku anoxických podmienok tým, že sa zabezpečí, aby veká kultivačných nádob umožňovali primeranú výmenu plynov s atmosférou. Pôda by sa mala každý týždeň opatrne rozrušiť, aby sa uľahčilo prevzdušňovanie.

Červy sa môžu kŕmiť ovsenými vločkami. Vločky by sa mali skladovať v hermeticky uzavretých nádobách a pred použitím by sa mali autoklávovať alebo zahriať, aby sa zabránilo zamoreniu múčnymi roztočmi (napr. rod *Glyzyphagus, Astigmata, Acarina*) alebo dravými roztočmi [napríklad *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina*]. Po tepelnom ošetrení by sa mala potrava rozomlieť, aby ju bolo možné ľahko rozsypať na povrch pôdy. Z času na čas sa ovsené otruby môžu doplniť pridaním vitamínov, mlieka a oleja z tresčej pečene. Inými vhodnými zdrojmi potravy sú pekárske kvasnice a krmivo pre ryby TetraMin.

Kŕmenie prebieha približne dvakrát týždenne. Primerané množstvo ovsených otrúb sa rozsype na povrch pôdy alebo sa opatrne zamieša do substrátu pri rozrušovaní pôdy na uľahčenie prevzdušňovania. Absolútne množstvo poskytnutej potravy závisí od počtu červov prítomných v substráte. Ako usmernenie platí, že množstvo potravy by sa malo zvýšiť, ak sa všetka spotrebuje počas dňa, keď bola poskytnutá. Naopak, ak potrava zostáva na povrchu aj v čase druhého kŕmenia (o týždeň neskôr), jej množstvo by sa malo znížiť. Potrava kontaminovaná rastom plesní by sa mala odstrániť a nahradiť. Po troch mesiacoch by sa červy mali presunúť do čerstvo pripraveného substrátu.

Kultivačné podmienky sa považujú za vyhovujúce, ak sa červy: a) nepokúšajú opustiť pôdny substrát, b) rýchlo pohybujú v pôde, c) majú lesklý vonkajší povrch bez prichytených častíc pôdy, d) majú viac-menej belavú farbu, e) vykazujú v kultúrach rozličné vekové kategórie a f) sústavne sa reprodukujú.

Dodatok 5

Vykonanie testu s inými druhmi rodu *Enchytraeus*

Výber druhov

Použiť sa môžu aj iné druhy než *E. albidus*, ale zodpovedajúcim spôsobom by sa mal upraviť postup testovania a kritériá platnosti. Keďže mnohé druhy rodu *Enchytraeus* sú ľahko dostupné a je možné ich uspokojivo udržiavať v laboratóriu, najdôležitejším kritériom pri výbere iných druhov ako *E. albidus* je ekologický význam, ako aj ich porovnateľná citlivosť. Na zmenu druhov môžu byť aj formálne dôvody. Napríklad v krajinách, kde sa druh *E. albidus* nevyskytuje a nie je možné ho dovážať (napr. v dôsledku karanténnych obmedzení), bude potrebné použiť iný druh rodu *Enchytraeus*.

Príklady vhodných alternatívnych druhov

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide a Graefe 1992): v posledných rokoch sa tento druh často používa v ekotoxikologických štúdiách pre jednoduchosť chovu a testovania. Je však malý, a preto je manipulácia s ním zložitejšia v porovnaní s druhom *E. albidus* (najmä v štádiách pred použitím metódy farebného označovania). V prípade druhu *E. crypticus* nebolo s istotou zistené, či sa vyskytuje na poliach, a opísaný bol iba z kultúr dážďoviek. Jeho ekologické potreby preto nie sú známe.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): názov pravdepodobne zahŕňa skupinu blízko príbuzných druhov, ktoré sú morfologicky ťažko rozlíšiteľné. Jeho použitie na testovanie sa neodporúča, pokiaľ jedince, ktoré by sa mali použiť v rámci testu, nie je možné druhovo identifikovať. Červy druhu *E. buchholzi* sa zvyčajne vyskytujú na lúkach a v narušených oblastiach, ako je okolie ciest.

— *Enchytraeus luxuriosus*: tento druh bol pôvodne známy ako *E. minutus*, a bol opísaný až nedávno (1). Prvýkrát ho objavil U. Graefe (Hamburg) na lúke v blízkosti St. Peter-Ording (spolková krajina Šlezvicko-Holštajnsko, Nemecko). Červy druhu *E. luxuriosus* majú približne polovičnú veľkosť v porovnaní s druhom *E. albidus*, ale sú väčšie v porovnaní s ostatnými uvádzanými druhmi, čo by z nich mohlo robiť dobrú alternatívu druhu *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen a Christensen 1963): tento druh bol doteraz hlásený z Nemecka a Španielska, kde žije v minerálnych pôdach a jeho výskyt je bežný, ale obvykle nie veľmi hojný. V porovnaní s inými malými druhmi tohto rodu je pomerne ľahko identifikovateľný. Nič nie je známe o jeho správaní v rámci laboratórnych testov ani o jeho citlivosti na chemikálie. Zistilo sa však, že sa ľahko kultivuje (E. Belotti, osobná komunikácia).

Chovné podmienky

Všetky uvedené druhy rodu *Enchytraeus* je možné kultivovať v rovnakých substrátoch, aké sa používajú v prípade druhu *E. albidus*. Ich menšia veľkosť znamená, že kultivačné nádoby môžu byť menšie a že sa síce môže používať rovnaká potrava, ale musí sa upraviť veľkosť dávky. Životný cyklus týchto druhov je kratší ako v prípade druhu *E. albidus*, preto by sa kŕmenie malo vykonávať častejšie.

Podmienky testu

Podmienky testu sú vo všeobecnosti rovnaké ako tie, ktoré sa vzťahujú na druh *E. albidus*, okrem toho, že

— veľkosť testovacej nádoby môže (ale nemusí) byť menšia,

— čas trvania reprodukčného testu môže (ale nemusí) byť kratší, t. j. štyri namiesto šiestich týždňov, pričom čas trvania testu na vyhľadávanie rozsahu by sa nemal meniť,

— vzhľadom na malé rozmery juvenilných červov sa dôrazne odporúča použiť pri počítaní metódu farebného označovania;

— kritérium platnosti vzťahujúce sa na počet juvenilných jedincov na testovaciu nádobu v kontrolnej vzorke by sa malo zmeniť na ‚50'.

LITERATÚRA

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

Dodatok 6

Podrobný opis techník extrakcie

Farebné označovanie bengálskou červeňou

Použitie tejto metódy, pôvodne vyvinutej pre sladkovodné životné prostredie (1), na počítanie juvenilných jedincov čeľade *Enchytraeidae* prvýkrát navrhol W. De Coen (Univerzita Gent, Belgicko) v rámci reprodukčného testu čeľade Enchytraeidae. Upravenú verziu (bengálska červeň zmiešaná s formaldehydom namiesto etanolu) nezávisle vypracoval inštitút RIVM v Bilthovene (2) (3).

Na konci konečného testu (t. j. po šiestich týždňoch) sa pôda z testovacích nádob prenesie do plytkej nádoby. Vhodná na tento účel je bellaplastová nádoba alebo fotografická miska s rebrovaným dnom, lebo ‚rebrá' obmedzujú pohyb červov v oblasti pozorovania. Mladé jedince sú fixované etanolom (približne 5 ml na replikát). Do nádob sa potom naleje voda tak, aby tvorila vrstvu 1 – 2 cm. Pridá sa niekoľko kvapiek (200 – 300 µl) bengálskej červene (1 % roztok v etanole) (alternatívou je 0,5 % eozín) a obidve zložky sa dôkladne premiešajú. Po 12 hodinách by mali byť červy červenkasto sfarbené a malo by byť možné ich ľahko spočítať, lebo budú ležať na povrchu substrátu. Alternatívne sa môže zmes substrátu a alkoholu pred spočítaním červov preprať cez sito (veľkosť ôk: 0,25 mm). Použitím tohto postupu sa kaolinit, rašelina a časť piesku vymyjú a červenkasté červy sa budú jednoduchšie vyhľadávať a počítať. Počítanie uľahčí aj použitie šošoviek s osvetlením (šošovky s veľkosťou najmenej 100 × 75 mm a s dvojnásobným až trojnásobným faktorom zväčšenia).

Technika farebného označovania skracuje čas počítania na niekoľko minút na nádobu a ako usmernenie platí, že by malo byť možné, aby jedna osoba bola schopná posúdiť všetky nádoby z jedného testu v priebehu maximálne dvoch dní.

Mokrá extrakcia

Mokrá extrakcia by sa mala začať okamžite po skončení testu. Pôda z každej testovacej nádoby sa umiestni do plastových sít s veľkosťou ôk približne 1 mm. Sitá sa potom zavesia do plastových misiek bez dotyku s dnom. Misky sa opatrne naplnia vodou tak, aby vzorky v sitách boli úplne pod vodnou hladinou. S cieľom zabezpečiť výťažnosť viac ako 90 % prítomných červov by extrakcia mala prebiehať tri dni pri teplote 20 °C ± 2 °C. Po skončení extrakcie sa sitá vyberú a voda (s výnimkou malého množstva) sa pomaly vyleje, pričom sa dbá na to, aby sa nenarušil sediment na dne misiek. Plastové misky sa potom mierne pretrepú, aby suspendoval sediment vo vrstve vody. Voda sa preleje do Petriho misky a po usadení častíc pôdy sa môžu červy čeľade *Enchytraeidae* identifikovať, premiestniť a spočítať s použitím stereomikroskopu a jemnej oceľovej pinzety.

Flotácia

Metódu založenú na flotácii opísal vo svojej práci R. Kuperman (4). Po fixovaní obsahu testovacej nádoby etanolom sa pôda zaleje prípravkom Ludox (koloidný silikát AM-30, 30 hm. % suspenzia vo vode) do výšky 10 – 15 mm nad povrch pôdy. Po dôkladnom premiešaní pôdy s flotačným činidlom v trvaní 2 – 3 minút plávajú juvenilné červy na povrchu a je možné ich ľahko spočítať.

LITERATÚRA

1. Kořínková, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestník Československé Společnosti Zoologické 32, 300-305.

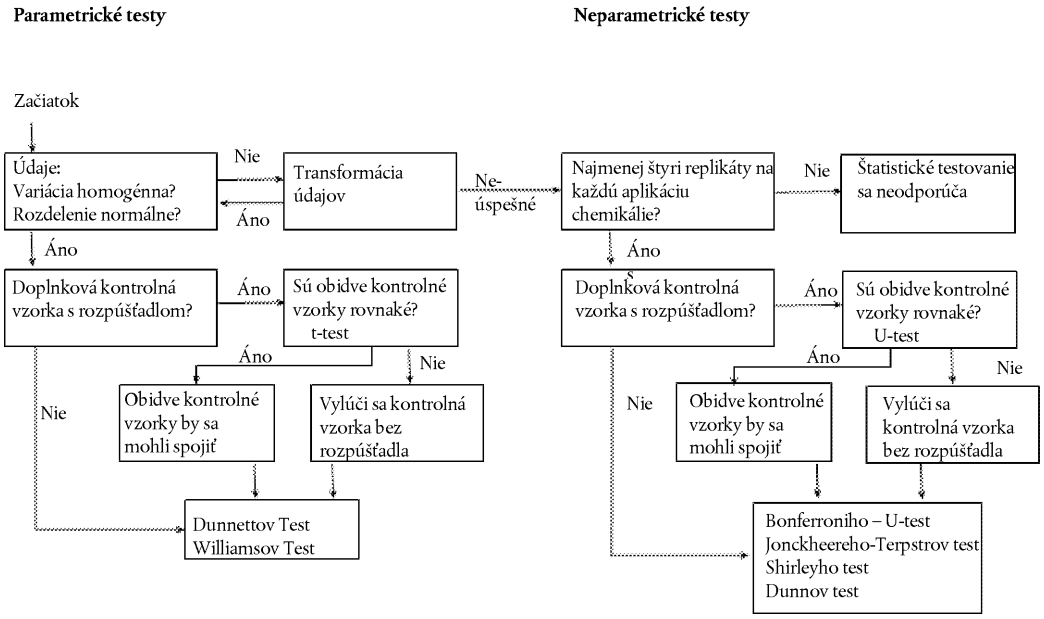
2. Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta, Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

3. Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

4. Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

Dodatok 7

Prehľad štatistického posúdenia údajov (stanovenie hodnoty NOEC)



C.33. REPRODUKČNÝ TEST S DÁŽĎOVKAMI (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 222 (2004). Je určená na posúdenie účinkov chemikálií v pôde na reprodukčný výstup (a ďalších subletálnych parametrov) dážďoviek druhu *Eisenia fetida* (Savigny 1826) alebo *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1) (2). Metóda bola podrobená kruhovému testu (3). Existuje testovacia metóda pre test akútnej toxicity pre dážďovky (4). Uverejnené boli viaceré iné medzinárodné a vnútroštátne usmernenia pre akútne a chronické testy s dážďovkami (5) (6) (7) (8).

2. Druhy *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* sa považujú za jedných zo zástupcov pôdnej fauny a predovšetkým dážďoviek. Základné informácie o ekológii dážďoviek a ich používaní v ekotoxikologickom testovaní sú k dispozícii v literatúre (7) (9) (10) (11) (12).

PRINCÍP TESTU

3. Dospelé červy sú vystavené účinkom rôznych koncentrácií testovanej chemikálie, buď zamiešanej do pôdy, alebo, v prípade pesticídov, aplikovanej na povrch alebo do pôdy s použitím postupov, ktoré sú v súlade so spôsobom používania chemikálie. Metóda aplikácie je špecifická na účely testu. Rozsah testovacích koncentrácií sa vyberá tak, aby zahŕňal tie, ktoré môžu počas ôsmich týždňov spôsobiť subletálne i letálne účinky. Účinky na mortalitu a rast dospelých červov sa stanovia po štyroch týždňoch expozície. Dospelé jedince sa potom vyberú z pôdy a účinky na reprodukciu sa posudzujú po ďalších štyroch týždňoch sčítaním počtu potomstva prítomného v pôde. Výstup reprodukcie červov vystavených testovanej chemikálii sa porovnáva s reprodukčným výstupom kontrolných vzoriek s cieľom stanoviť hodnoty i) koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC) a/alebo ii) koncentrácie EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) pomocou regresného modelu na odhad koncentrácie, ktorá by spôsobila zníženie reprodukčného výstupu o x %. Koncentrácia EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) by mala byť v rozsahu testovacích koncentrácií, aby sa potom hodnota EC_x určila interpoláciou namiesto extrapolácie (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

4. Na pomoc pri vypracovaní vhodných postupov testovania by mali byť k dispozícii tieto informácie týkajúce sa testovanej chemikálie:

— rozpustnosť vo vode,

— log K_{ow},

— tlak pary

— a ak je to možné, informácie o osude a správaní testovanej chemikálie v životnom prostredí (napr. rýchlosť fotolýzy a hydrolýzy, pokiaľ je to dôležité z hľadiska spôsobov aplikácie).

5. Táto testovacia metóda sa môže použiť na všetky chemikálie bez ohľadu na ich rozpustnosť vo vode. Testovacia metóda nie je použiteľná v prípade prchavých chemikálií, vymedzených na tento účel ako chemikálie, pre ktoré je hodnota Henryho konštanty alebo rozdeľovacej konštanty vzduch/voda vyššia ako jeden, alebo chemikálie, pre ktoré tlak pary pri teplote 25 °C presahuje hodnotu 0,0133 Pa.

6. V rámci tejto testovacej metódy neexistuje žiadna povolená odchýlka, pokiaľ ide o možnú degradáciu testovanej chemikálie počas celého trvania testu. Následne nie je možné predpokladať, že expozičné koncentrácie sa počas celého testu budú udržiavať na počiatočných hodnotách. V tom prípade sa odporúča vykonať chemickú analýzu testovanej chemikálie na začiatku a na konci testu.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

7. S cieľom zabezpečiť, aby boli laboratórne podmienky testu primerané, a overiť, či sa reakcia testovaných organizmov postupom času štatisticky výrazne nezmenila, sa musia stanoviť hodnoty NOEC a/alebo EC_x referenčnej chemikálie. Odporúča sa testovať referenčnú chemikáliu najmenej raz ročne, alebo ak sa testovanie vykonáva zriedkavejšie, súbežne so stanovením toxicity testovanej chemikálie. Vhodnými referenčnými chemikáliami sú karbendazim a benomyl, pri ktorých sa preukázalo, že ovplyvňujú reprodukciu (3). Výrazné účinky by sa mali pozorovať pri hodnotách a) 1 – 5 mg účinnej zložky/kg suchej hmotnosti alebo b) 250 – 500 g/ha alebo 25 – 50 mg/m². Ak sa do série testov zahrnie pozitívny štandard toxicity, použije sa jedna koncentrácia a počet replikátov by mal byť rovnaký ako pri kontrolných vzorkách.

PLATNOSŤ TESTU

8. Na to, aby sa výsledok testu považoval za platný, by kontrolné vzorky mali spĺňať tieto kritériá:

— v každom replikáte (obsahujúcom 10 dospelých jedincov) by malo byť do konca testu vyprodukovaných ≥ 30 juvenilných jedincov,

— variačný koeficient reprodukcie by mal byť ≤ 30 %,

— mortalita dospelých jedincov počas počiatočných 4 týždňov testu by mala byť ≤ 10 %.

Ak test nespĺňa uvedené kritériá platnosti, jeho vykonávanie by sa malo ukončiť, pokiaľ nie je možné predložiť odôvodnenie pokračovania testu. Toto odôvodnenie by malo byť zahrnuté do protokolu o skúške.

OPIS TESTU

Zariadenia

9. Používať by sa mali testovacie nádoby vyrobené zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu s objemom približne jeden až dva litre. Nádoby by mali mať v priereze plochu približne 200 cm², aby sa dosiahla hĺbka vlhkého substrátu okolo 5 – 6 cm, keď sa pridá 500 – 600 g sušiny substrátu. Konštrukcia veka nádoby by mala umožniť výmenu plynov medzi substrátom a atmosférou a prístup svetla (napr. perforované priesvitné veko) a zároveň zabrániť úniku červov. Ak je množstvo používaného testovacieho substrátu podstatne väčšie než 500 – 600 g na jednu testovaciu nádobu, počet červov by sa mal úmerne zvýšiť.

10. Potrebné je bežné laboratórne vybavenie, konkrétne toto:

— skrinka na sušenie,

— stereomikroskop,

— pH-meter a fotometer,

— vhodné presné váhy,

— primerané zariadenie na regulovanie teploty,

— primerané zariadenie na regulovanie vlhkosti (nie je to nevyhnutné, ak nádoby s exponovanými vzorkami majú veká),

— inkubátor alebo malá miestnosť s klimatizačným zariadením,

— pinzety, háčiky alebo slučky,

— vodný kúpeľ.

Príprava umelej pôdy

11. V tomto teste sa používa umelo pripravená pôda (5) (7) s týmto zložením (na základe sušiny vysušenej na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C):

— 10 percent rašeliny (pH čo najbližšie k hodnotám 5,5 – 6,0, bez viditeľných rastlinných zvyškov, jemne mletá, vysušená na meraný obsah vlhkosti),

— 20 percent kaolínovej hliny (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 percent),

— 0,3 – 1 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, práškový, analytickej čistoty) na dosiahnutie počiatočnej hodnoty pH 6,0 ± 0,5,

— 70 % vzduchom vysušeného kremenného piesku (v závislosti od potrebného množstva $CaCO_3$), prevažne jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 mikrónov.

Poznámka 1: potrebné množstvo $CaCO_3$ bude závisieť od zložiek pôdneho substrátu vrátane potravy a malo by sa stanoviť meraním čiastkových vzoriek pôdy tesne pred testom; hodnota pH sa meria v zmiešanej vzorke roztoku 1 M chloridu draselného (KCl) alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) (13).

Poznámka 2: Obsah organického uhlíka v umelo pripravenej pôde môže klesnúť, napríklad znížením obsahu rašeliny na 4 – 5 % a zodpovedajúcim zvýšením obsahu piesku. V dôsledku takéhoto poklesu obsahu organického uhlíka sa môžu znížiť možnosti adsorpcie testovanej chemikálie na pôdu (organický uhlík) a dostupnosť testovanej chemikálie pre červy sa môže zvýšiť. Preukázalo sa, že červy druhu *Eisenia fetida* môžu spĺňať kritériá platnosti reprodukcie v prípade, keď sa testy vykonávajú v poľných pôdach s nižším obsahom organického uhlíka (napr. 2,7 %) (14), a existujú praktické skúsenosti potvrdzujúce, že toto je možné dosiahnuť aj v umelo pripravenej pôde s 5 % rašeliny. Preto nie je potrebné pred použitím takejto pôdy na konečný test preukazovať, že umelo pripravená pôda je vhodná na dosiahnutie súladu s kritériami platnosti testu, pokiaľ obsah rašeliny neklesne viac, ako bolo uvedené.

Poznámka 3: Vhodnosť pôdy a splnenie kritérií platnosti testu by sa mali preukázať aj v prípade použitia prírodnej pôdy v ďalšom testovaní (napr. vyššieho stupňa).

12. Suché zložky pôdy sa dôkladne zmiešajú (napr. vo veľkokapacitnom laboratórnom miešači) v dobre vetranom priestore. Pred začiatkom testu sa suchá umelo pripravená pôda zvlhčí pridaním dostatočného množstva deionizovanej vody, aby sa dosiahla približne polovica konečného obsahu vody, čo je 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody (čo zodpovedá 50 % ± 10 % vlhkosti sušiny). Tým vznikne substrát, v ktorom sa pri stláčaní rukou neobjaví stojaca ani voľná voda. Maximálna kapacita zadržiavania vody umelej pôdy sa stanoví v súlade s postupmi uvedenými v dodatku 2 k norme ISO 11274 (15) alebo v rovnocennej norme EÚ.

13. Ak sa testovaná chemikália aplikuje na povrch pôdy alebo sa zamieša do pôdy bez vody, konečné množstvo vody sa môže zamiešať do umelo pripravnej pôdy počas prípravy pôdy. Ak sa testovaná chemikália zamieša do pôdy spolu s určitým množstvom vody, ďalšia voda sa môže pridať spolu s testovanou chemikáliou (pozri bod 19).

14. Obsah vlhkosti v pôde sa stanoví na začiatku a na konci testu v súlade s normou ISO 11465 (16) alebo rovnocennou normou EÚ a hodnota pH pôdy sa stanoví v súlade s dodatkom 3 alebo normou ISO 10390 (13) alebo rovnocennou normou EÚ. Tieto hodnoty by sa mali stanoviť z kontrolnej vzorky pôdy a zo vzorky pôdy s každou testovanou koncentráciou. Hodnota pH pôdy by sa pri testovaní kyslých alebo zásaditých chemikálií nemala upravovať. Obsah vlhkosti by sa mal monitorovať počas celého testu pravidelným vážením nádob (pozri body 26 a 30).

Výber a príprava testovacích živočíchov

15. Živočíšne druhy použité v teste sú *Eisenia fetida* alebo *Eisenia andrei* (1) (2). Na začiatok testu sú potrebné dospelé červy vo veku dva mesiace až jeden rok a s vyvinutým opaskom (clitellum). Červy by sa mali vybrať zo synchronizovanej kultúry s relatívne homogénnou vekovou štruktúrou (dodatok 4). Jedinci v rámci skupiny by sa nemali líšiť vo veku o viac ako 4 týždne.

16. Vybraté červy by sa mali aklimatizovať najmenej jeden deň s typom umelého pôdneho substrátu, ktorý sa má použiť v rámci testu. Počas tohto obdobia by sa červy mali kŕmiť tou istou potravou, ktorá sa má použiť v rámci testu (pozri body 31 – 33).

17. Na začiatku testu by sa mali skupiny 10 červov jednotlivo vážiť a náhodne zaraďovať do testovacích nádob. Červy sa pred vážením umyjú (deionizovanou vodou) a prebytočná voda sa odstráni tak, že sa červy nakrátko položia na filtračný papier. Čerstvá hmotnosť jednotlivých červov by mala dosahovať hodnotu od 250 do 600 mg.

Príprava testovaných koncentrácií

18. Použiť sa môžu dve metódy aplikácie testovanej chemikálie: miešanie testovanej chemikálie do pôdy (pozri body 19 – 21) alebo aplikácia na povrchu pôdy (pozri body 22 – 24). Výber vhodnej metódy závisí od účelu testu. Vo všeobecnosti sa odporúča miešanie testovanej chemikálie do pôdy. Môžu však byť potrebné postupy aplikácie, ktoré sú v súlade s bežnou poľnohospodárskou praxou (napr. nástrek kvapalného prípravku alebo použitie špeciálnych prípravkov na ochranu rastlín, ako sú granuly alebo moridlá osiva). Rozpúšťadlá používané na pomoc pri aplikovaní testovanej chemikálie do pôdy by sa mali vyberať na základe ich nízkej toxicity pre dážďovky a do koncepcie testu musí byť zahrnutá primeraná kontrola rozpúšťadla (pozri bod 27).

Miešanie testovanej chemikálie do pôdy

Testovaná chemikália rozpustná vo vode

19. Roztok testovanej chemikálie v deionizovanej vode sa pripravuje tesne pred začiatkom testu v množstve dostatočnom pre všetky replikáty jednej koncentrácie. Na uľahčenie prípravy testovacieho roztoku môže byť potrebné pomocné rozpúšťadlo. Je vhodné pripraviť také množstvo roztoku, aké je potrebné na dosiahnutie konečného obsahu vlhkosti (40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody). Roztok sa pred vložením do testovacej nádoby dôkladne premieša s pôdnym substrátom.

Testovaná chemikália nerozpustná vo vode

20. Testovaná chemikália sa rozpustí v malom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. acetónu) a potom sa nastrieka na malé množstvo jemného kremenného piesku, alebo sa s ním zmieša. Rozpúšťadlo sa potom odstráni aspoň niekoľkominútovým odparovaním pod digestorom. Piesok s aplikovanou chemikáliou sa následne dôkladne zmieša s predvlhčenou umelo pripravenou pôdou. Potom sa pridá a zamieša deionizovaná voda (potrebné množstvo), aby sa dosiahol konečný obsah vlhkosti 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody. Pôda je tým pripravená na vloženie do testovacích nádob. Je potrebné dbať na to, že niektoré rozpúšťadlá môžu byť toxické pre dážďovky.

Testovaná chemikália rozpustná vo vode a v organických rozpúšťadlách

21. Pripraví sa zmes zložená z 10 g jemne drveného priemyselného kremenného piesku a testovanej chemikálie v množstve potrebnom na dosiahnutie testovanej koncentrácie v pôde. Zmes sa potom dôkladne premieša s predvlhčenou umelo pripravenou pôdou. Potom sa pridá a zamieša deionizovaná voda (potrebné množstvo), aby sa dosiahol konečný obsah vlhkosti 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody. Pôda je tým pripravená na vloženie do testovacích nádob.

Aplikácia testovanej chemikálie na povrch pôdy

22. Testovaná chemikália sa aplikuje do pôdy až po vložení červov. Testovacie nádoby sa najskôr naplnia navlhčeným pôdnym substrátom a na povrch sa uložia odvážené červy. Zdravé červy sa spravidla okamžite zahrabú do substrátu a následne sa všetky, ktoré zostanú na povrchu aj po 15 minútach, označia za poškodené a musia sa vymeniť. Ak sa červy vymenia, tie nové aj tie nahradené by sa mali odvážiť, aby bola známa celková živá hmotnosť skupiny červov vystavených pôsobeniu chemikálie a celková hmotnosť nádoby s červami na začiatku testu.

23. Aplikuje sa testovaná chemikália. Nemala by sa pridávať do pôdy skôr ako pol hodiny po vložení červov (alebo kým sa červy nachádzajú na povrchu pôdy), aby sa tak predišlo akejkoľvek priamej expozícii testovanej chemikálie pri styku s povrchom tela. Ak je testovanou chemikáliou pesticíd, môže byť vhodné aplikovať ho na povrch pôdy striekaním. Testovaná chemikália by sa mala aplikovať na povrch pôdy čo najrovnomernejšie použitím vhodného laboratórneho striekacieho zariadenia, aby sa simulovala aplikácia pri postreku na poli. Pred aplikáciou by sa malo odobrať veko testovacej nádoby a nahradiť vložkou, ktorá chráni bočné steny nádoby pred postrekom. Vložka sa môže vyrobiť z testovacej nádoby s odstráneným podstavcom. Aplikácia by sa mala vykonať pri teplote v rozsahu 20 °C ± 2 °C a v prípade vodných roztokov, emulzií alebo disperzií pri aplikačnej dávke vody 600 – 800 µl/m2. Veľkosť dávky by sa mala overiť pomocou vhodnej kalibračnej metódy. Osobitné prípravky ako granuly alebo moridlá osiva by sa mali používať spôsobom, ktorý je v súlade s poľnohospodárskym použitím.

24. Testovacie nádoby by sa mali hodinu nechať odkryté, aby sa mohlo odpariť prchavé rozpúšťadlo použité pri aplikácii testovanej chemikálie. Treba dbať na to, aby žiadny červ v priebehu tohto času neunikol z testovacích nádob.

POSTUP

Testované skupiny a kontrolné vzorky

25. Odporúča sa vložiť 10 dážďoviek do 500 – 600 g sušiny umelo pripravenej pôdy (t. j. 50 – 60 g pôdy na červa). Ak sa použijú väčšie množstvá pôdy, čo by mohol byť prípad testovania pesticídov s osobitnými spôsobmi aplikácie, napríklad pomocou moridla osiva, mal by sa pri vkladaní zachovať pomer 50 – 60 g pôdy na jedného červa, a to zvýšením počtu červov. Pre každú nádobu s kontrolnou vzorkou a so vzorkou s aplikovanou chemikáliou sa pripraví desať červov. Červy sa umyjú vodou, otrú a potom sa nakrátko uložia na absorpčný papier, čo umožní, aby odtiekla prebytočná voda.

26. S cieľom predísť systematickým chybám v rozdelení červov do testovacích nádob by sa mala určiť homogenita testovanej populácie individuálnym vážením 20 červov náhodne vybratých z populácie, z ktorej sa majú vybrať testované červy. Po zabezpečení homogenity sa vyberú šarže červov, odvážia sa a metódou náhodného výberu sa zaradia do testovacích nádob. Po vložení testovacích červov by sa mala odmerať hmotnosť každej testovacej nádoby, aby sa zabezpečil údaj o počiatočnej hmotnosti, ktorý sa môže použiť ako základ na monitorovanie obsahu vlhkosti v pôde pomocou testu uvedeného v bode 30. Testovacie nádoby sa potom uzavrú, ako je opísané v bode 9, a uložia do testovacej komory.

27. Pre každú z metód aplikácie testovanej chemikálie opísaných v bodoch 18 – 24 sa pripraví vhodná kontrolná vzorka. Pri príprave kontrolných vzoriek sa dodržiavajú príslušné uvedené postupy, s výnimkou toho, že sa nepridá testovaná chemikália. Preto ak je to potrebné, do kontrolných vzoriek sa pridávajú organické rozpúšťadlá, kremenný piesok alebo iné nosiče v koncentráciách/množstvách, ktoré sú v súlade s rovnakými parametrami používanými pri vzorkách s aplikovanou chemikáliou. Ak sa na pridávanie testovanej chemikálie používa rozpúšťadlo alebo iný nosič, mala by sa pripraviť a otestovať aj doplnková kontrolná vzorka bez nosiča alebo testovanej chemikálie, aby sa zabezpečilo, že nosič nemá vplyv na výsledok.

Podmienky testu

28. Testovacia teplota je 20 °C ± 2 °C. Test sa vykonáva za kontrolovaných cyklov svetla a tmy (podľa možnosti 16 hodín svetla a 8 hodín tmy) s intenzitou osvetlenia 400 – 800 luxov v okolí testovacích nádob.

29. Testovacie nádoby sa počas testu neprevzdušňujú, ale konštrukcia veka testovacej nádoby by mala umožniť výmenu plynov a zároveň obmedziť odparovanie vlhkosti (pozri bod 9).

30. Obsah vody v pôdnom substráte v testovacích nádobách sa počas celého testu udržiava opakovaným vážením testovacích nádob (bez ich viek). Straty sa podľa potreby dopĺňajú deionizovanou vodou. Obsah vody by sa od začiatku testu nemal meniť o viac ako 10 %.

Kŕmenie

31. Akákoľvek potrava, ktorá je vhodná prinajmenšom na udržanie hmotnosti červa počas testu, sa považuje za prijateľnú. Zo skúseností vyplynulo, že vhodnou potravou je ovsená múka, kravský alebo konský hnoj. Kontroly by mali zabezpečiť, že kravy alebo kone, od ktorých sa hnoj získava, nepodstupujú liečbu alebo ošetrovanie chemickými látkami, ako sú rastové stimulátory, nematicídy alebo podobné veterinárne produkty, ktoré by mohli mať počas testu nepriaznivý vplyv na červy. Odporúča sa kravský hnoj získaný z vlastných zdrojov, lebo zo skúseností vyplynulo, že komerčne dostupný kravský hnoj, používaný ako záhradné hnojivo, môže mať nepriaznivé účinky na červy. Hnoj by sa mal pred použitím vysušiť vzduchom, jemne zomlieť a pasterizovať.

32. Každá čerstvá šarža potravy by sa pred použitím v rámci testu mala najskôr poskytnúť kultúre červov, ktorá sa na teste nepodieľa, aby sa zabezpečilo, že má dostatočnú kvalitu. Rast a produkcia kokónov by sa nemali znížiť v porovnaní s červami chovanými v substráte, ktorý neobsahuje potravu z novej šarže [podmienky, ako sú uvedené v testovacej metóde C.8 (4)].

33. Potrava sa prvýkrát poskytne jeden deň po pridaní červov a aplikácii testovanej chemikálie do pôdy. Približne 5 g potravy sa rozloží na povrch pôdy v každej nádobe a zvlhčí deionizovanou vodou (približne 5 – 6 ml na nádobu). Potom sa potrava poskytuje raz týždenne počas 4 týždňov trvania testu. Ak potrava zostáva neskonzumovaná, dávka by sa mala znížiť, aby sa zabránilo rastu a vytváraniu plesní. V 28. deň testu sa dospelé jedince vyberú z pôdy. Do každej testovacej nádoby sa potom podá ďalších 5 gramov potravy. V priebehu zostávajúcich 4 týždňov testu už žiadne ďalšie kŕmenie neprebieha.

Výber testovaných koncentrácií

34. Predchádzajúce poznatky o toxicite testovanej chemikálie by mali pomôcť pri výbere vhodných testovaných koncentrácií, napríklad z testu akútnej toxicity (4) a/alebo zo štúdií týkajúcich sa vyhľadávania rozsahu. V prípade potreby sa vykoná test na vyhľadávanie rozsahu, napríklad s piatimi testovanými koncentráciami: 0,1, 1,0, 10, 100 a 1 000 mg/kg (pôdnej sušiny). Na každú vzorku s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú vzorku stačí jeden replikát. Test na vyhľadávanie rozsahu trvá dva týždne a na konci testu sa posudzuje mortalita.

Koncepcia experimentu

35. Keďže testu nei je možné predpísať jediný súhrnný štatistický údaj, táto testovacia metóda umožňuje stanovenie hodnôt NOEC a EC_x. Je pravdepodobné, že regulačné orgány budú v dohľadnej budúcnosti vyžadovať hodnotu koncentrácie NOEC. Je tiež možné, že v blízkej budúcnosti sa zavedie širšie využívanie hodnoty EC_x, vyplývajúce zo štatistických a ekologických aspektov. Preto sa na základe odporúčaní vychádzajúcich z kruhového testu metódy testovania reprodukcie čeľade *Enchytraeidae* navrhujú tri koncepcie (17).

36. Pri stanovení rozsahu koncentrácií je treba mať na zreteli:

— na stanovenie hodnoty NOEC by sa malo testovať aspoň päť/dvanásť koncentrácií v geometrickej sérii. Odporúčajú sa štyri replikáty na každú testovanú koncentráciu a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 2,0.

— Na stanovenie hodnoty EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) sa odporúča testovať primeraný počet koncentrácií, ktoré vyvolajú aspoň štyri štatisticky významne odlišné stredné reakcie na tieto koncentrácie. Odporúčajú sa najmenej dva replikáty pre každú testovanú koncentráciu a šesť kontrolných replikátov. Faktor rozstupu sa môže meniť, t. j. môže mať hodnotu najviac 1,8 v očakávanom rozsahu účinkov a viac ako 1,8 pri vyšších a nižších koncentráciách.

— Kombinovaný prístup umožňuje určenie obidvoch koncentrácií, NOEC aj EC_x. Použiť by sa malo osem koncentrácií aplikovanej chemikálie v geometrickom rade. Odporúčajú sa štyri replikáty pre každú aplikáciu chemikálie a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 1,8.

Trvanie testu a merania

37. V 28. deň sa skontrolujú a spočítajú žijúce dospelé červy. Zaznamenať by sa mali aj zmeny v správaní (napr. neschopnosť zavŕtať sa do pôdy, ležanie bez pohybu) a v morfológii (napr. prítomnosť otvorených rán). Všetky dospelé červy sa potom vyberú z testovacích nádob, spočítajú a zvážia. Vyhľadávanie dospelých jedincov môže uľahčiť presun pôdy obsahujúcej červy na čistú podložku pred hodnotením. Červy vybraté z pôdy by sa mali pred vážením umyť (deionizovanou vodou) a prebytočná voda by sa mala odstrániť tak, že sa červy nakrátko umiestnia na filtračný papier. Červy, ktoré sa v danej chvíli nenájdu, sa zaznamenajú ako mŕtve, lebo je možné predpokladať, že takéto červy pred hodnotením uhynuli a rozložili sa.

38. Ak bola pôda z nádob odstránená, následne sa vráti späť (bez dospelých červov, ale obsahujúca všetky kokóny, ktoré sa vyprodukovali). Pôda sa potom inkubuje ďalšie štyri týždne za tých istých podmienok testu, s výnimkou toho, že kŕmenie sa vykoná len raz na začiatku tejto fázy testu (pozri bod 33).

39. Na konci druhého 4-týždňového obdobia sa postupmi opísanými v dodatku 5 stanoví počet juvenilných jedincov vyliahnutých z kokónov v testovacej pôde a počet kokónov. Počas celého testu by sa mali tiež zaznamenávať všetky príznaky zranenia alebo poškodenia červov.

Limitný test

40. Ak sa v rámci testu na vyhľadávanie rozsahu nepozorujú žiadne účinky ani pri najvyššej koncentrácii (t. j. 1 000 mg/kg), reprodukčný test sa vykoná ako limitný test s použitím koncentrácie 1 000 mg/kg. Limitný test umožní preukázať, či je hodnota NOEC z hľadiska reprodukcie vyššia ako limitná koncentrácia, a zároveň sa minimalizuje počet červov použitých v rámci testu. Pre vzorky pôdy s aplikovanou chemikáliou aj pre kontrolné vzorky by sa malo použiť osem replikátov.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

41. Hoci v dodatku 6 je uvedený prehľad, žiadne definitívne štatistické usmernenia na analýzu výsledkov testu táto testovacia metóda neposkytuje.

42. Jedným z parametrov je mortalita. Preto by sa mali zaznamenať aj zmeny v správaní (napr. neschopnosť zavŕtať sa do pôdy, ležanie bez pohybu pri sklenej stene testovacej nádoby) a v morfológii (napr. prítomnosť otvorených rán) dospelých jedincov, ako aj existencia každého juvenilného jedinca. Na stanovenie koncentrácie LC_{50} by sa mala spravidla používať probitová analýza (18) alebo logaritmická regresia. V prípadoch, keď je táto metóda analýzy nevhodná (napr. ak sú k dispozícii menej ako tri koncentrácie čiastočne spôsobujúce usmrtenie), je však možné použiť alternatívne metódy. Tieto metódy môžu zahŕňať pohyblivé priemery (19), upravenú Spearman-Karberovu metódu (20) alebo jednoduchú interpoláciu (napr. geometrickú strednú hodnotu LC_0 a LC_{100} vypočítanú ako súčin druhej odmocniny LC_0 a hodnoty LC_{100}).

43. Ďalším parametrom je plodnosť (t. j. počet vyprodukovaných mladých jedincov). Pokiaľ však ide o test na vyhľadávanie rozsahu, všetky ostatné škodlivé príznaky by sa mali uviesť v záverečnej správe. Štatistická analýza si vyžaduje výpočet aritmetickej strednej hodnoty $\bar{x}$ a štandardnej odchýlky vo vzťahu k reprodukcii pre vzorky s aplikovanou chemikáliou a kontrolné vzorky.

44. Ak sa vykonáva analýza rozptylu, štandardnú odchýlku (s) a stupne voľnosti (df) môže nahradiť odhad výberového rozptylu získaný postupom ANOVA a stupne jeho voľnosti za predpokladu, že rozptyl nezávisí od koncentrácie. V tomto prípade sa použije jedna hodnota rozptylu pre kontrolné vzorky a pre vzorky s aplikovanou chemikáliou. Tieto hodnoty sa zvyčajne vypočítajú pomocou komerčného štatistického softvéru s využitím výsledkov pre jednotlivé nádoby ako replikátov. Ak sa spájanie údajov pre negatívne kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom zdá byť primeranejšie než porovnávanie s jednou z týchto skupín v rámci testu, malo by sa testovaním zistiť, či nie sú výrazne odlišné (vhodné testy sú uvedené v bode 47 a dodatku 6).

45. Ďalšie štatistické testovanie a odvodzovanie závisí od toho, či majú hodnoty pre replikáty normálne rozdelenie a sú homogénne, pokiaľ ide o ich rozptyl.

Odhad koncentrácie NOEC

46. Uprednostniť by sa malo použitie výkonných testov. Mali by sa využívať informácie napríklad z predchádzajúcich skúseností z medzilaboratórnych porovnávacích skúšok, prípadne iné historické údaje o tom, či sú údaje približne normálne rozdelené. Homogénnosť rozptylu (homoskedasticita) je kritickejšia. Zo skúseností vyplýva, že rozptyl sa často zvyšuje s rastúcou strednou hodnotou. V týchto prípadoch by transformácia údajov mohla viesť k homoskedasticite. Taká transformácia by však mala byť založená na skúsenostiach s historickými údajmi, a nie na údajoch, ktoré sú predmetom prešetrovania. S homogénnymi údajmi by sa mali vykonať viaceré t-testy, ako napríklad Williamsov test (α = 0,05, jednostranný) (21) (22), alebo v určitých prípadoch Dunnettov test (23) (24). Je potrebné si uvedomiť, že v prípade nerovnakej replikácie sa tabuľkové t-hodnoty musia upraviť tak, ako navrhujú Dunnett a Williams. Niekedy sa reakcie nezvyšujú/neznižujú pravidelne v dôsledku veľkých odchýlok. V prípade výraznej odchýlky od monotónnosti je Dunnettov test vhodnejší. Ak sa vyskytnú odchýlky od homoskedasticity, môže byť vhodné podrobnejšie preskúmať možné účinky na rozptyly s cieľom rozhodnúť, či sa t-testy môžu použiť bez výraznejšej straty výkonnosti (25). Alternatívne sa môžu

použiť viacnásobné U-testy, napríklad Bonferroniho U-test podľa Holma (26), alebo v prípade, keď tieto údaje vykazujú heteroskedasticitu, ale inak sú v súlade so základným monotónnym priebehom krivky závislosti dávka-odpoveď, môže sa použiť iný neparametrický test [napr. Jonckheereho-Terpstrov (27) (28) alebo Shirleyho (29) (30)], pričom vo všeobecnosti sú tieto testy uprednostňované pred t-testami s nerovnakým rozptylom (pozri tiež náčrt v dodatku 6).

47. Ak sa vykonáva limitný test a sú splnené podmienky postupov parametrického testu (normalita, homogenita), môže sa použiť Studentov párový t-test, v opačnom prípade Mannov-Whitneyho postup U-testu (31).

Odhad koncentrácie EC_x

48. Pri výpočte ktorejkoľvek hodnoty EC_x sa na regresnú analýzu (lineárnu alebo nelineárnu) používajú stredné hodnoty pre jednotlivé vzorky s aplikovanou chemikáliou, a to po získaní vhodnej funkcie závislosti dávky a reakcie. Pre rast červov ako nepretržitú reakciu sa hodnoty EC_x môžu odhadnúť použitím vhodnej regresnej analýzy (32). Medzi vhodné funkcie pre kvantálne údaje (mortalita/prežitie) a počet vyprodukovaných potomkov patria bežný sigmoid, logistická alebo Weibullova funkcia s dvomi až štyrmi parametrami, pričom niektoré z týchto funkcií môžu modelovať aj hormetické reakcie. Ak sa lineárnou regresnou analýzou určila funkcia závislosti dávky a reakcie, mal by sa pred odhadom hodnoty EC_x nájsť regresnou analýzou významný koeficient determinácie (r^2) a/alebo sklon zadaním hodnoty zodpovedajúcej x % strednej hodnoty pre kontrolnú vzorku do rovnice získanej regresnou analýzou. Hranice spoľahlivosti 95 % sa vypočítajú podľa Fiellera [citovaný v práci Finneyho (18)] alebo inými modernými vhodnými metódami.

49. Alternatívne sa reakcia modeluje ako percentuálna časť alebo podiel modelového parametra, ktorý sa interpretuje ako stredná hodnota reakcie kontrolnej vzorky. V týchto prípadoch sa výsledky často môžu ľahko znázorniť normálnou (logistickou, Weibullovou) sigmoidnou krivkou s použitím postupu probitovej regresie (18). V týchto prípadoch sa váhová funkcia musí upraviť na metrické reakcie, ako uvádza Christensen (33). Ak sa však pozoruje horméza, probitovú analýzu by mala nahradiť logistická alebo Weibullova funkcia so štyrmi parametrami, určená postupom nelineárnej regresie (34). Ak z údajov nie je možné určiť vhodnú funkciu závislosti dávky a reakcie, môžu sa na odhad hodnoty EC_x a jej hraníc spoľahlivosti použiť alternatívne metódy, ako sú pohyblivé priemery podľa Thompsona (19) a upravený Spearman-Karberov postup (20).

PROTOKOL O SKÚŠKE

50. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— úplný opis testovanej chemikálie, číslo šarže, číslo dávky a číslo CAS, čistota,

— vlastnosti testovanej chemikálie [napr. log K_{ow}, rozpustnosť vo vode, tlak pary, Henryho konštanta (H) a informácie o jej osude a správaní].

Testované organizmy:

— použité testované živočíchy: druh, vedecký názov, zdroj organizmov a podmienky chovu,

— vek, veľkosť (hmotnosť) testovaných organizmov.

Podmienky testu

— podrobnosti o príprave testovacej pôdy,

— maximálna kapacita zadržiavania vody v pôde,

— opis metódy, ktorá sa použila na aplikáciu testovanej chemikálie do pôdy,

— údaje o pomocných chemikáliách použitých na podávanie testovanej chemikálie,

— kalibračné údaje o rozstrekovacích zariadeniach, ak je to potrebné,

— opis koncepcie experimentu a postupu,

— veľkosť testovacích nádob a objem testovacej pôdy,

— podmienky testu: intenzita svetla, trvanie cyklov svetla a tmy, teplota,

— opis kŕmneho režimu, druh a množstvo potravy, ktorá sa používala v rámci testu, dátumy kŕmenia,

— hodnoty pH a obsahu vody v pôde na začiatku a na konci testu.

Výsledky testu:

— mortalita dospelých jedincov (%) v každej testovacej nádobe na konci prvých 4 týždňov testu,

— celková hmotnosť dospelých jedincov na začiatku testu v každej testovacej nádobe,

— zmeny telesnej hmotnosti živých dospelých jedincov (% počiatočnej hmotnosti) v každej testovacej nádobe po prvých štyroch týždňoch testu,

— počet juvenilných jedincov vyprodukovaných v každej testovacej nádobe na konci testu,

— opis zjavných alebo patologických príznakov alebo výrazných zmien v správaní,

— výsledky získané s referenčnými vzorkami testovanej chemikálie,

— hodnoty LC_{50}, NOEC a/alebo EC_x (napr. EC_{50}, EC_{10}) pre reprodukciu, ak sú niektoré z nich použiteľné, spolu s intervalmi spoľahlivosti a grafom, ktorý znázorňuje model ich výpočtu, ako aj všetky informácie a pozorovania, ktoré môžu byť nápomocné pri interpretácii výsledkov,

— diagram vzťahu dávky a účinku,

— výsledky uplatniteľné na každú testovaciu nádobu.

Uvedú sa odchýlky od postupov opísaných v tejto testovacej metóde a všetky nezvyčajné udalosti počas testu.

LITERATÚRA

1. Jaenicke, J. (1982). ‚*Eisenia foetida*' is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

2. Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 – 282.

3. Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.

4. Chapter C.8 of this Annex, Earthworm acute toxicity test.

5. ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

6. ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.

7. SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.

8. EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.

9. Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

10. Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

11. Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

12. Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

13. (ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

14. Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

15. ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.

16. ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

17. Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

18. Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

19. Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

20. Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

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

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

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

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

25. Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

26. Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

27. Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

28. Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

29. Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

30. Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

31. Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

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

33. Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

34. Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov:

Chemikália je látka alebo zmes.

EC_x (účinná koncentrácia x %) je koncentrácia, ktorá v rámci stanoveného času expozície vyvolá účinok x % na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Napríklad EC_{50} je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že v stanovenom čase expozície vyvolá účinok na výsledok testu pri 50 % exponovanej populácie. V rámci tohto testu sa účinné koncentrácie vyjadrujú ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy alebo ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku plochy pôdy.

LC_0 (nulová letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku nespôsobí usmrtenie testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC_0 vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovanej pôdy.

LC_{50} (stredná letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku spôsobí usmrtenie 50 % testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC50 vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy alebo ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku plochy pôdy.

LC_{100} (absolútna letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku spôsobí usmrtenie 100 % testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC_{100} vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovanej pôdy.

LOEC (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom) je najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá má štatisticky významný účinok ($p < 0,05$). V rámci tohto testu sa LOEC vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy alebo ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku plochy pôdy. Všetky testovacie koncentrácie vyššie ako LOEC by za normálnych okolností mali vyvolať účinok, ktorý je štatisticky odlišný od kontrolných vzoriek. Akékoľvek odchýlky od uvedeného musia byť odôvodnené v správe o teste.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie, bezprostredne pod koncentráciou LOEC, pri ktorej sa nepozoruje žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného expozičného času v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Miera reprodukcie je stredná hodnota počtu narodených juvenilných červov na počet dospelých červov počas testu.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Dodatok 2

Stanovenie kapacity zadržiavania vody umelej pôdy

Táto metóda sa považuje za vhodnú. Opísaná je v prílohe C normy ISO DIS 11268-2.

Pomocou vhodného zariadenia (špirálová trubica atď.) sa odoberie určené množstvo (napr. 5 g) testovacieho pôdneho substrátu. Spodná časť trubice sa zakryje kúskom filtračného papiera a po naplnení vodou sa umiestni na stojan vo vodnom kúpeli. Trubica by sa mala postupne ponárať do vody, až kým vodná hladina nestúpne nad vrchnú vrstvu pôdy. Potom by sa mala nechať vo vode približne tri hodiny. Keďže nie všetka voda, ktorú absorbujú kapiláry pôdy, sa môže zachovať, vzorke pôdy by sa malo umožniť odvodnenie počas dvoch hodín tak, že sa trubica uloží na vrstvu veľmi mokrého jemne drveného kremenného piesku v uzavretej nádobe (aby sa zabránilo vysúšaniu). Vzorka by sa potom mala odvážiť a vysušiť na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kapacitu zadržiavania vody (WHC) je možné vypočítať takto:

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

kde:

S = vodou saturovaný substrát + hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera,

T = hmotnosť obalu (hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera),

D = suchá hmotnosť substrátu.

LITERATÚRA:

1. ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

Dodatok 3

Stanovenie pH pôdy

Táto metóda stanovenia pH pôdy je založená na opise uvedenom v norme ISO DIS 10390: Kvalita pôdy – stanovenie pH (1).

Určené množstvo pôdy sa suší pri teplote miestnosti najmenej 12 hodín. Potom sa vytvorí suspenzia pôdy (obsahujúca najmenej 5 g pôdy) s päťnásobným objemom 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) analytickej čistoty alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) analytickej čistoty. Suspenzia sa následne päť minút dôkladne pretrepáva a potom sa nechá stáť najmenej 2 hodiny, ale nie dlhšie ako 24 hodín. Hodnota pH kvapalnej fázy sa potom meria pH metrom, ktorý sa pred každým meraním kalibruje pomocou vhodnej série tlmivých roztokov (napr. s pH 4,0 a 7,0).

LITERATÚRA:

(1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

Dodatok 4

Kultivácia druhov *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*

Chov by mal prednostne prebiehať v klimatickej komore pri teplote 20 °C ± 2 °C. Pri tejto teplote a zabezpečení dostatku potravy červy dospejú približne po dvoch až troch mesiacoch.

Oba druhy je možné kultivovať v širokej škále živočíšnych odpadov. Odporúčané chovné médium je zmes konského alebo kravského hnoja a rašeliny v pomere 50: 50. Kontroly by mali zabezpečiť, že kravy alebo kone, od ktorých sa hnoj získava, nepodstupujú liečbu alebo ošetrovanie chemickými látkami, ako sú rastové stimulátory, nematicídy alebo podobné veterinárne produkty, ktoré by mohli mať počas testu nepriaznivý vplyv na červy. Odporúča sa hnoj získaný z ‚organických' zdrojov, lebo zo skúseností vyplynulo, že komerčne dostupný hnoj, používaný ako záhradné hnojivo, môže mať nepriaznivé účinky na červy. Médium by malo mať hodnotu pH približne 6 – 7 (upravenú pomocou uhličitanu vápenatého), nízku iónovú vodivosť (menej ako 6 mS/cm alebo 0,5 % koncentrácie soli) a nemalo by byť nadmerne kontaminované amoniakom alebo živočíšnym močom. Substrát by mal byť vlhký, ale nie príliš mokrý. Vhodné sú chovné nádoby s objemom 10 – 50 litrov.

Na získanie červov štandardného veku a veľkosti (hmotnosti) je najlepšie začať kultiváciou kokónov. Kultúra sa po vytvorení udržiava umiestnením dospelých červov do chovnej nádoby s čerstvým substrátom na 14 až 28 dní s cieľom umožniť produkciu ďalších kokónov. Dospelé jedince sa potom premiestnia a juvenilné jedince vyliahnuté z kokónov sa použijú ako základ pre ďalšiu kultúru. Červy sa kŕmia nepretržite živočíšnym odpadom a z času na čas sa presúvajú do čerstvého substrátu. Zo skúseností vyplynulo, že vhodnou potravou je vzduchom sušený, jemne mletý kravský alebo konský hnoj alebo ovsená múka. Je potrebné zabezpečiť, aby kravy alebo kone, od ktorých sa hnoj získava, neboli liečené chemickými látkami, ako sú rastové stimulátory, ktoré by mohli mať negatívny vplyv na červy počas dlhodobej kultivácie. Červy vyliahnuté z kokónov sa používajú na testovanie, keď majú 2 – 12 mesiacov a považujú sa za dospelé jedince.

Červy je možné považovať za zdravé, ak sa pohybujú v substráte, nesnažia sa opustiť substrát a priebežne sa rozmnožujú. Vyčerpanie substrátu sa prejavuje tým, že červy sa pohybujú veľmi pomaly a zadnú časť tela majú žltú. V tomto prípade sa odporúča zabezpečiť čerstvý substrát a/alebo znížiť hustotu chovu.

Dodatok 5

Techniky na počítanie juvenilných červov vyliahnutých z kokónov

Ručné triedenie červov v pôdnom substráte je veľmi časovo náročné. Preto sa odporúčajú dve alternatívne metódy:

a) Testovacie nádoby sa umiestnia do vodného kúpeľa s počiatočnou teplotou 40 °C, ktorá sa však zvýši na 60 °C. Po približne 20 minútach by sa na povrchu pôdy mali objaviť juvenilné červy, odkiaľ je možné ich ľahko vybrať a spočítať.

b) Testovacia pôda sa môže premyť cez sito pomocou metódy, ktorú vypracovali van Gestel a kol. (1), za predpokladu, že rašelina a hnoj alebo ovsená múka, pridávané do pôdy, boli pomleté na jemný prášok. Dve sitá s veľkosťou ôk 0,5 mm (priemer 30 cm) sa uložia na seba. Obsah skúšobnej nádoby sa premyje cez sitá silným prúdom vody z vodovodu, pričom juvenilné červy a kokóny sa zachytia prevažne na vrchnom site. Je dôležité si uvedomiť, že celý povrch vrchného sita by mal počas tejto operácie zostať mokrý, aby sa mladé červy vznášali na vrstve vody, a tak sa im zabránilo v preliezaní okami sita. Najlepšie výsledky sa dosahujú, ak sa používa sprchová hlavica.

Keď sa všetok pôdny substrát premyje cez sitá, juvenilné jedince a kokóny sa môžu spláchnuť z vrchného sita do misy. Obsah misy sa potom nechá odstáť, pričom prázdne kokóny vyplávajú na hladinu vody a plné kokóny a mladé červy sa potopia na dno. Odstáta voda sa potom môže vyliať a mladé červy a kokóny sa presunú do Petriho misky s malým množstvom vody. Červy je možné povyberať na počítanie pomocou ihly alebo pinzety.

Zo skúseností vyplynulo, že metóda a) je vhodnejšia na vyberanie juvenilných červov, ktoré sa môžu spláchnuť aj cez sito s veľkosťou ôk 0,5 mm.

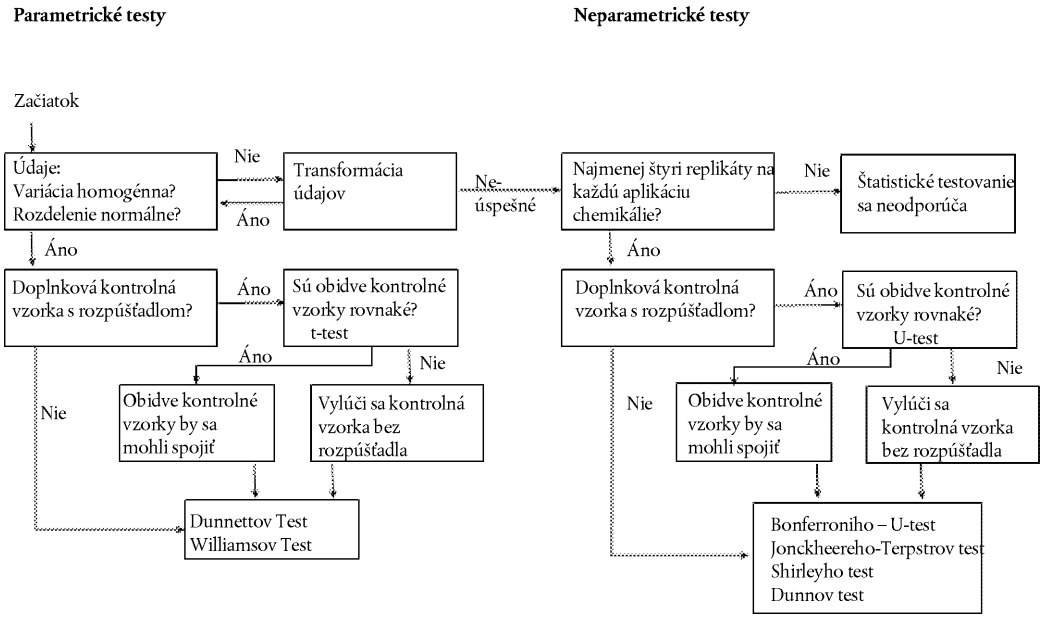
Zakaždým by sa mala stanoviť účinnosť metódy použitej na vyberanie červov (a prípadne kokónov) z pôdneho substrátu. Ak sa juvenilné jedince vyberajú technikou ručného triedenia, odporúča sa vykonať túto operáciu dvakrát na všetkých vzorkách.

LITERATÚRA:

(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.

Dodatok 6

Prehľad štatistického posúdenia údajov (stanovenie hodnoty NOEC)



C.34. STANOVENIE INHIBÍCIE ČINNOSTI ANAERÓBNYCH BAKTÉRIÍ – ZNÍŽENIE PRODUKCIE PLYNU Z ANAERÓBNE VYHNÍVAJÚCEHO (ČISTIARENSKÉHO) KALU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 224 (2007). Chemikálie vypúšťané do vodného prostredia prechádzajú aeróbnymi aj anaeróbnymi zónami, kde môžu degradovať a/alebo inhibovať činnosť baktérií. V niektorých prípadoch môžu nerušene zostať v anaeróbnych zónach celé desaťročia alebo aj dlhšie. Pri čistení odpadových vôd je prvá fáza – primárne usadzovanie – v kvapalnom supernatante aeróbne a v kalovom subnatante anaeróbne. Ďalej sa v druhej fáze aeróbna zóna nachádza v aktivovanom kale v prevzdušňovacej nádrži a anaeróbna zóna v kalovom subnatante v sekundárnej usadzovacej nádrži. Kal z obidvoch týchto fáz zvyčajne prechádza anaeróbnou úpravou, pričom vzniká metán a oxid uhličitý, ktoré sa spravidla používajú na výrobu elektrickej energie. V širšom prostredí chemikálie prenikajúce do sedimentov v zálivoch, ústiach riek a v mori pravdepodobne zostanú v týchto anaeróbnych zónach natrvalo, ak nie sú biodegradovateľné. Určité chemikálie preniknú do týchto zón vo väčšom množstve najmä vďaka svojim fyzikálnym vlastnostiam, ako je nízka rozpustnosť vo vode, vysoká adsorpcia na suspendované tuhé látky, ako aj neschopnosť aeróbnej biodegradácie.

2. Je žiaduce, aby chemické látky vypúšťané do životného prostredia boli biodegradovateľné v aeróbnych aj anaeróbnych podmienkach, zároveň je však potrebné, aby takéto chemikálie neinhibovali činnosť mikroorganizmov v žiadnej z uvedených zón. V Spojenom kráľovstve sa vyskytlo niekoľko prípadov úplnej inhibície tvorby metánu, spôsobenej napríklad pentachlórfenolom vo vypúšťaných priemyselných odpadových vodách, čo viedlo k veľmi nákladnej preprave inhibovaného kalu z vyhnívacích nádrží na ‚bezpečné' skládky a dovozu zdravo vyhnívajúceho kalu zo susedných zariadení. Vyskytli sa však mnohé prípady menej závažného narušenia vyhnívania viacerými ďalšími chemikáliami vrátane alifatických halogénovaných uhľovodíkov (chemické čistenie) a detergentov, čo viedlo k výraznému zníženiu účinnosti vyhnívacej nádrže.

3. Iba jedna testovacia metóda, C.11 (1), sa zaoberá inhibíciou činnosti baktérií (respirácia aktivovaného kalu), keď posudzuje účinok testovanej látky na mieru spotreby kyslíka v prítomnosti substrátu. Metóda sa vo veľkej miere využíva na včasné varovanie pred možnými škodlivými účinkami chemikálií na aeróbnu úpravu odpadových vôd, ako aj pri určovaní neinhibičných koncentrácií testovaných chemikálií, ktoré sa majú používať v rôznych testoch biodegradovateľnosti. Testovacia metóda C.43 (2) poskytuje obmedzené možnosti na stanovenie toxicity testovanej chemikálie pre produkciu plynu v anaeróbnom kale, zriedenom na jednu desatinu bežnej koncentrácie tuhých látok s cieľom umožniť požadovanú presnosť pri posudzovaní percentuálnej hodnoty biodegradácie. Keďže zriedený kal by mohol byť citlivejší na inhibičné chemikálie, skupina ISO sa rozhodla vypracovať metódu, pri ktorej sa používa nezriedený kal. Preskúmali sa najmenej tri texty (z Dánska, Nemecka a Spojeného kráľovstva) a nakoniec boli vypracované dve normy ISO, jedna s použitím nezriedeného kalu – ISO 13 641-1 (3) a druhá s použitím kalu zriedeného na jednu stotinu – ISO 13 641-2 (4), ktoré predstavujú kaly a sedimenty s malým množstvom bakteriálnych kultúr. Obe metódy boli podrobené medzilaboratórnej porovnávacej skúške (5): časť 1 bola potvrdená ako prijateľná norma, no časť 2 vyvolala nesúhlas. Zástupcovia Spojeného kráľovstva sa domnievali, že metóda si vyžaduje ďalšie preskúmanie, keďže veľká časť účastníkov uvádzala veľmi nízku alebo žiadnu produkciu plynu, čiastočne z toho dôvodu, že podiel priestoru pre plyn bol príliš vysoký (75 %) na optimálnu citlivosť.

4. V starších prácach uverejnených v Spojenom kráľovstve (6) (7) bola opísaná manometrická metóda, pri ktorej sa používal nezriedený vyhnívajúci kal a surový čistiarenský kal ako substrát v 500 ml bankách. Zariadenie bolo neskladné a zápach surového kalu nepríjemný. Neskôr Wilson a kol. (10) úspešne používali kompaktnejšie a vhodnejšie prístroje Sheltona a Tiedjeho (8), ktoré zdokonalili Battersby a Wilson (9). Kawahara a kol. (11) v laboratóriu úspešne pripravili štandardnejšie kaly na použitie v rámci testov anaeróbnej biodegradovateľnosti a inhibície pre množstvo chemikálií. Okrem toho bol surový kal ako substrát nahradený a test sa vykonáva s použitím anaeróbneho kalu zriedeného na jednu stotinu alebo s kalmi, sedimentmi atď. s malou bakteriálnou činnosťou.

5. Táto metóda môže poskytnúť informácie, ktoré sú užitočné pri predpovedaní pravdepodobného účinku testovanej chemikálie na produkciu plynu v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach. Iba dlhšie testy, ktoré dôslednejšie simulujú fungujúce vyhnívacie nádrže, však môžu ukázať, či môže dôjsť k adaptácii mikroorganizmov na testovanú chemikáliu, alebo či chemikálie, ktoré pravdepodobne kal absorbuje alebo adsorbuje, môžu vytvoriť toxickú koncentráciu na dlhšie obdobie, než umožňuje tento test.

PRINCÍP TESTU

6. Alikvotné časti zmesi anaeróbne vyhnívajúceho kalu (20 – 40 g/l celkových tuhých látok) a degradovateľného substrátového roztoku sa inkubujú samostatne a súčasne s rôznymi koncentráciami testovanej chemikálie v utesnených nádobách najviac tri dni. Množstvo vyprodukovaného plynu (metán a oxid uhličitý) sa zisťuje meraním nárastu tlaku (v Pa) vo fľašiach. Percentuálna hodnota inhibície produkcie plynu v dôsledku rôznych koncentrácií testovanej chemikálie sa vypočíta na základe množstiev vyprodukovaných v príslušných testovacích a kontrolných fľašiach. Hodnota EC_{50} a iné účinné koncentrácie sa vypočítajú z diagramov závislosti percentuálnej inhibície od koncentrácie testovaných chemikálií, alebo, čo je zvyčajnejšie, jej logaritmu.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

7. Testované chemikálie by sa mali spravidla používať v najčistejšej bežne dostupnej forme, keďže nečistoty v niektorých chemikáliách, napríklad v chlórfenoloch, môžu byť oveľa toxickejšie než samotná testovaná chemikália. Je však potrebné tiež zvážiť potrebu, aby sa chemikálie testovali vo forme, v ktorej sa vyrábajú/komerčne sprístupňujú. Použitie pripravených výrobkov sa bežne neodporúča, ale v prípade slabo rozpustných testovaných látok môže byť použitie pripraveného materiálu vhodné. Vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré by mali byť k dispozícii, zahŕňajú rozpustnosť vo vode a v niektorých organických rozpúšťadlách, tlak pary, adsorpčný koeficient, hydrolýzu a biodegradovateľnosť v anaeróbnych podmienkach.

POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

8. Tento test je možné použiť na chemikálie, ktoré sú rozpustné alebo nerozpustné vo vode vrátane prchavých chemikálií. Osobitnú pozornosť je však potrebné venovať materiálom s nízkou rozpustnosťou vo vode [pozri literatúru (12)] a vysokou prchavosťou. Použiť sa môžu aj inokulá z anaeróbnych miest, ako sú napríklad kaly, nasýtené pôdy, sedimenty. Anaeróbne bakteriálne systémy, ktoré už boli vystavené pôsobeniu toxických chemikálií, môžu byť prispôsobené na zachovanie svojej činnosti v prítomnosti xenobiotických chemikálií. Inokulá z prispôsobených bakteriálnych systémov môžu prejavovať vyššiu toleranciu voči testovaným chemikáliám v porovnaní s inokulami získanými z neprispôsobených systémov.

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

9. S cieľom kontrolovať postup sa testuje referenčná chemikália vo vhodných nádobách, paralelne, ako súčasť bežného testu. Ako konzistentný inhibítor produkcie anaeróbneho plynu, ako aj spotreby kyslíka aktivovaným kalom a iných biochemických reakcií sa ukázal 3,5-dichlórfenol. Dve ďalšie chemikálie sa ukázali byť viac inhibujúce vo vzťahu k metánu než 3,5-dichlórfenol, konkrétne metylén bis(tiokyanát) a pentachlórfenol, ale výsledky s nimi neboli validované. Pentachlórfenol sa neodporúča, lebo nie je ľahko dostupný v čistej forme.

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV

10. V medzinárodnej porovnávacej skúške (5) sa medzi desiatimi zúčastnenými laboratóriami ukázala ako dostatočná iba reprodukovateľnosť hodnôt EC_{50} pre 3,5-dichlórfenol a kyselinu 2-brómetán-sulfónovú. (Rozsah pre 3,5-dichlórfenol bol 32 – 502 mg/l a pre kyselinu 2-brómetán-sulfónovú 220 – 2 190 mg/l).

Počet laboratórií	mg/l			mg/g kalu		
	stredná hodnota	s.d.	cv(%)	stredná hodnota	s.d.	cv(%)
	3,5-dichlórfenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	kyselina 2-brómetán-sulfónová					
10	1 058	896	85	34	26	76

Údaje EC_{50} z medzilaboratórnej porovnávacej skúšky – neriedený kal

11. Vysoké variačné koeficienty medzi laboratóriami do veľkej miery odrážajú rozdiely v citlivosti mikroorganizmov v kale spôsobené skutočnosťou, že v minulosti buď boli vystavené, alebo neboli vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie alebo iných chemicky príbuzných chemikálií. Presnosť, s akou sa stanovila hodnota EC_{50} na základe koncentrácie kalu, bola sotva vyššia než v prípade hodnoty stanovenej na základe objemu (mg/l). Tri laboratóriá, ktoré uviedli presnosť svojich hodnôt EC_{50} pre 3,5-dichlórfenol, vykázali oveľa nižšie variačné koeficienty (22, 9 a 18 % pre EC_{50} v mg/g), než boli variačné koeficienty stredných hodnôt všetkých desiatich laboratórií. Jednotlivé stredné hodnoty pre tri laboratóriá boli 3,1, 3,2 a 2,8 mg/g. Nižšie, prijateľné variačné koeficienty v rámci jednotlivých laboratórií v porovnaní s oveľa vyššími koeficientmi medzi rôznymi laboratóriami, t. j. 9 – 22 %, resp. 92 %, naznačujú, že existujú výrazné rozdiely vo vlastnostiach jednotlivých kalov.

OPIS METÓDY

Zariadenie

12. Potrebné je bežné laboratórne vybavenie a tieto zariadenia:

a) inkubátor – odolný proti iskrám a s udržiavanou teplotou 35 °C ± 2 °C;

b) tlaku odolné sklené testovacie nádoby primeraných menovitých rozmerov ([1]), z ktorých každá je vybavená plynotesnými poťahovanými priehradkami, schopnými odolávať tlaku približne 2 bary alebo 2×10^5 Pa (ako poťah sa používa napríklad PTFE = polytetrafluóretylén). Odporúčajú sa sklené fľaše na sérum s menovitým objemom 125 ml, so skutočným objemom približne 160 ml, utesnené sérovou priehradkou ([2]) a drážkovanými hliníkovými prstencami. Vhodné sú však aj fľaše s celkovým objemom 0,1 – 1 liter;

c) presný tlakomer ([3]) a ihlový nástavec;

celková produkcia plynu (metán a oxid uhličitý) sa meria pomocou tlakomera prispôsobeného na meranie a odvádzanie vyprodukovaného plynu. Príkladom vhodného prístroja je ručný presný tlakomer s pripojenou injekčnou ihlou a trojcestným plynotesným ventilom, ktorý umožňuje uvoľnenie nadmerného tlaku (dodatok 1). Vnútorný objem rúrky a ventilu snímača tlaku by mal byť čo najmenší, aby boli chyby, ktoré vznikajú zanedbaním objemu zariadenia, zanedbateľné;

d) izolované nádoby na prepravu vyhnívajúceho kalu;

e) trojcestné tlakové ventily;

f) sito so štvorcovými okami so stranou 1 mm;

g) zásobník na vyhnívajúci kal – fľaša zo skla alebo z polyetylénu s vysokou hustotou, s objemom približne 5 litrov, vybavená miešadlom a zariadením na prúdenie plynného dusíka (pozri bod 13) cez voľný priestor nad kalom;

h) membránové filtre (0,2 µm) na sterilizáciu substrátu;

([1]) Odporúčaná veľkosť je 0,1 litra až 1 liter.

([2]) Odporúča sa používať plynotesné silikónové priehradky. Ďalej sa odporúča, aby sa tesnosť uzáverov, predovšetkým butylkaučukových priehradiek, testovala, lebo viaceré komerčne dostupné priehradky nie sú dostatočne plynotesné proti metánu a niektoré priehradky strácajú tesnosť, keď sa prepichnú ihlou podľa podmienok testu.
— Plynotesné poťahované priehradky sa odporúčajú a používať sa musia v prípade prchavých chemikálií (niektoré komerčné priehradky sú pomerne tenké, menej ako 0,5 cm, a nezostávajú plynotesné po prepichnutí injekčnou ihlou).
— Butylkaučukové priehradky (približne 1 cm) sa odporúčajú, ak testované látky nie sú prchavé (po prepichnutí spravidla zostávajú plynotesné).
— Pred testom sa odporúča dôkladne preskúmať priehradky, či sú schopné zostať po prepichnutí plynotesné.

([3]) Merač by sa mal používať a kalibrovať v pravidelných intervaloch podľa pokynov výrobcu. Ak sa používa tlakomer predpísanej kvality, napríklad opuzdrený oceľovou membránou, nie je potrebná žiadna kalibrácia v laboratóriu. Kalibrovať by ho mala oprávnená inštitúcia v odporúčaných intervaloch. Presnosť kalibrácie je možné skontrolovať v laboratóriu jednobodovým meraním pri tlaku 1×10^5 Pa proti tlakomeru s mechanickým displejom. Ak sa tento bod meria správne, lineárnosť bude tiež nezmenená. Ak sa používajú iné meracie prístroje (bez certifikovanej kalibrácie výrobcom), odporúča sa prepočítanie v celom rozsahu v pravidelných intervaloch (dodatok 2).

i) mikrostriekačky na plynotesné pripojenie snímača tlaku [pozri bod 12 c)] k voľnému priestoru vo fľašiach [pozri bod 12 b)] a tiež na pridávanie nerozpustných kvapalných testovacích materiálov do fliaš;

j) odkladacia schránka, nepovinná, ale odporúčaná, s mierne pozitívnym tlakom dusíka.

Reagenty

13. Používajú sa výlučne reagenty analytickej čistoty. Vždy by sa mal používať plynný dusík vysokej čistoty s obsahom menej ako 5 µl/l kyslíka.

Voda

14. Ak je v ktoromkoľvek štádiu potrebné zriedenie, používa sa deionizovaná, vopred odvzdušnená voda. Analytické kontroly tejto vody nie sú potrebné, ale treba zabezpečiť, aby sa pravidelne vykonávala údržba deionizačného prístroja. Deionizovaná voda sa používa aj na prípravu zásobných roztokov. Pred pridaním anaeróbneho inokula do akéhokoľvek roztoku alebo pred zriedením testovaného materiálu je potrebné sa ubezpečiť, že neobsahujú kyslík. To sa vykoná buď vháňaním plynného dusíka do vody (alebo do roztokov) počas 1 hodiny pred pridaním inokula, alebo prípadne zahriatím vody na teplotu varu a ochladením na teplotu miestnosti v atmosfére bez obsahu kyslíka.

Vyhnívajúci kal

15. Vyhnívajúci kal sa aktívne zbiera z vyhnívacích nádrží v čistiarňach odpadových vôd, alebo alternatívne z laboratórnych vyhnívacích nádrží, kde sa spracováva kal prevažne z odpadových vôd z domácností. Praktické informácie týkajúce sa kalu z laboratórnych vyhnívacích nádrží je možné nájsť v literatúre pod číslom (11). Ak sa má používať upravené inokulum, je možné uvažovať o vyhnívajúcom kale z čistiarní priemyselných odpadových vôd. Na zbieranie kalu by sa mali používať fľaše so širokým hrdlom vyrobené z polyetylénu s vysokou hustotou alebo podobného materiálu, ktorý môže expandovať. Kal sa naloží do fliaš na vzorky až do výšky 1 cm od vrchu fľaše, fľaše sa pevne uzavrú, najlepšie bezpečnostným ventilom [bod 12 písm. e)], a uložia sa do izolovaných nádob [bod 12 písm. d)], aby sa minimalizoval teplotný šok, až kým sa nepremiestnia do inkubátora s udržiavanou teplotou 35 °C ± 2 °C. Pri otváraní fliaš je potrebné zabezpečiť uvoľnenie nadmerného tlaku plynu buď opatrným otvorením uzáveru, alebo pomocou trojcestného ventilu na uvoľňovanie tlaku [bod 12 písm. e)]. Kal by sa mal prednostne použiť do niekoľkých hodín od odberu, inak je potrebné ho uskladniť pri teplote 35 °C ± 2 °C pod vrstvou dusíka najviac na tri dni, kým spravidla dochádza k malým stratám činnosti.

Upozornenie – Vyhnívajúci kal vytvára horľavé plyny, ktoré predstavujú riziko vzniku požiaru a výbuchu a obsahuje aj potenciálne patogénne organizmy. Preto je potrebné pri manipulácii s kalom prijať primerané opatrenia. Z bezpečnostných dôvodov sa na zber kalu nepoužívajú sklené nádoby.

Inokulum

16. Bezprostredne pred použitím sa kal jemne premieša a preleje cez sito s rozmermi ôk 1 mm^2 [bod 12 písm. f)] do vhodnej fľaše [bod 12 písm. g)] cez priestor, ktorým prechádza prúd dusíka. Vytvorí sa vzorka na meranie koncentrácie celkovej sušiny [pozri napríklad normu ISO 11 923 (13) alebo rovnocennú normu EÚ]. Vo všeobecnosti sa kal používa bez riedenia. Koncentrácia tuhých látok je zvyčajne 2 – 4 hm. %. Skontrolujú sa hodnoty pH kalu a v prípade potreby sa upravia na hodnotu 7 ± 0,5.

Testovací substrát

17. V deionizovanej vode sa rozpustí 10 g živín (napr. Oxoid), 10 g kvasnicového extraktu a 10 g D-glukózy a zriedi sa na 100 ml. Substrát sa sterilizuje filtráciou cez membránový filter 0,2 µm [bod 12 písm. h)] a okamžite sa použije, alebo sa uskladní pri teplote 4 °C najviac na jeden deň.

Testovaná chemikália

18. Pripraví sa samostatný zásobný roztok pre každú testovanú chemikáliu rozpustnú vo vode, ktorý obsahuje napríklad 10 g/l chemikálie vo vode bez kyslíka (bod 14). Vhodné objemy týchto zásobných roztokov sa použijú pri príprave reakčných zmesí obsahujúcich odstupňované koncentrácie. Alternatívne sa pripraví séria zriedení každého zásobného roztoku tak, aby bol objem pridaný do testovacích fliaš rovnaký pre každú požadovanú konečnú koncentráciu. Hodnota pH zásobných roztokov by sa mala v prípade potreby upraviť na 7 ± 0,2.

19. Informácie týkajúce sa testovaných chemikálií, ktoré sú nedostatočne rozpustné vo vode, sú uvedené v norme ISO 10 634 (12) alebo rovnocennej norme EÚ. Ak je potrebné použiť organické rozpúšťadlo, treba sa vyhnúť rozpúšťadlám, ako je chloroform a chlorid uhličitý, ktoré sú známe ako silné inhibítory produkcie metánu. Pripraví sa roztok príslušnej koncentrácie chemikálie nerozpustnej vo vode vo vhodnom prchavom rozpúšťadle, napríklad v acetóne alebo dietyléteri. Do prázdnych testovacích fliaš sa nalejú potrebné objemy roztoku s rozpúšťadlom [bod 12 písm. b)] a pred pridaním kalu sa rozpúšťadlo odparí. V prípade iných foriem aplikácie chemikálie sa treba riadiť normou ISO 10 634 (12) alebo rovnocennou normou EÚ, ale je potrebné si uvedomiť, že všetky povrchovo aktívne látky používané na prípravu emulzií môžu byť inhibítormi anaeróbnej produkcie plynu. Ak sa predpokladá, že prítomnosť organických rozpúšťadiel a emulgačných činidiel spôsobuje vznik artefaktov, testovanú chemikáliu je možné pridať priamo do testovacej zmesi vo forme prášku alebo tekutiny. Prchavé chemikálie a vo vode nerozpustné kvapalné testované chemikálie sa môžu vstreknúť do sérových fliaš s inokulom mikrostriekačkou [bod 12 písm. i)].

20. Testované chemikálie sa pridávajú do fliaš tak, aby vznikol geometrický rad koncentrácií, napríklad 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l a 15,6 mg/l. Ak rozsah toxicity nie je známy z údajov o podobných látkach, najskôr sa vykoná predbežná skúška na vyhľadávanie rozsahu s koncentráciou 1 000 mg/l, 100 mg/l a 10 mg/l s cieľom stanoviť primeraný rozsah.

Referenčná chemikália

21. Vodný roztok 3,5-dichlórfenolu (10 g/l) sa pripraví postupným pridávaním minimálneho množstva 5 mol/l roztoku hydroxidu sodného k pevnej látke a pretrepávaním až do rozpustenia. Potom sa riedi odkysličenou vodou (bod 14) až do požadovaného objemu, pričom rozpúšťaniu môže pomôcť použitie ultrazvuku. Použiť sa môžu aj iné referenčné chemikálie, ak sa dosiahol priemerný rozsah koncentrácie EC_{50} v rámci najmenej troch testov s rôznymi inokulami (rôzne zdroje alebo rôzne časy odberu).

INTERFERENCIA/CHYBY

22. Niektoré zložky kalov by pravdepodobne mohli reagovať s potenciálnymi inhibítormi a zabrániť ich prístupu k mikroorganizmom, a tým znížiť alebo znemožniť inhibíciu. Aj v prípade, že kal už obsahuje chemikáliu, ktorá je inhibičná, môže sa dospieť k chybným výsledkom, ak bola daná chemikália podrobená testu. Okrem uvedených možností existuje viacero identifikovaných faktorov, ktoré môžu viesť k nesprávnym výsledkom. Tie sú uvedené v dodatku 3 spolu s metódami eliminovania alebo aspoň zredukovania chýb.

POSTUP SKÚŠKY

23. Počet potrebných replikátov závisí od stupňa presnosti požadovaného pre indexy inhibície. Ak sú uzávery fliaš počas trvania testu dostatočne plynotesné, pripraví sa len jedna séria (najmenej troch) testovacích fliaš na každú požadovanú koncentráciu. Podobne sa pripraví len jedna séria fliaš s referenčnou chemikáliou a jeden súbor kontrolných vzoriek. Ak je však tesnosť uzáverov fliaš spoľahlivá iba pre jedno alebo niekoľko prepichnutí, je potrebné pripraviť sériu (napr. troch) testovacích fliaš pre každý interval (t), pre ktorý sa požadujú výsledky pre všetky koncentrácie testovanej chemikálie, ktoré sa majú testovať. Podobne sa pripravia série ‚t' fliaš pre referenčné chemikálie a pre kontrolné vzorky.

24. Odporúča sa používať odkladaciu schránku [bod 12 písm. j)]. Najmenej 30 minút pred začiatkom testu treba spustiť prietok plynného dusíka cez odkladaciu schránku obsahujúcu celé potrebné vybavenie. Je potrebné zabezpečiť, aby počas manipulácie s fľašami a ich uzatváraní teplota kalu dosahovala hodnotu 35 °C ± 2 °C.

Predbežná skúška

25. Ak činnosť kalu nie je známa, odporúča sa vykonať predbežnú skúšku. Pripravia sa kontrolné vzorky, napríklad s koncentráciou tuhých látok 10 g/l, 20 g/l a 40 g/l a so substrátom, ale bez testovanej chemikálie. Používajú sa tiež rozdielne objemy reakčnej zmesi s cieľom dosiahnuť tri alebo štyri hodnoty pomeru objemu uzavretého priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny. Z výsledkov objemu plynu vyprodukovaného v rôznych časových intervaloch je možné stanoviť najvhodnejšie podmienky, ktoré umožňujú dve merania denne, každodenné získavanie značných objemov plynu a uvoľňovanie tlaku pri optimálnej citlivosti ([1]) bez strachu z výbuchov.

([1]) Uvedené platí na experimentálnu zostavu a experimentálne podmienky, na základe ktorých je možné odhadnúť objemy vyprodukovaného plynu – z kontrolných slepých vzoriek a z nádob ukazujúcich 70 – 80 % inhibíciu – s prijateľnou mierou chybovosti.

Pridanie testovaných chemikálií

26. Testované chemikálie rozpustné vo vode sa pridajú do prázdnych testovacích fliaš [bod 12 písm. b)] ako vodné roztoky (bod 18). Používajú sa najmenej tri série fliaš pre každý rozsah koncentrácií (bod 20). Nerozpustné a slabo rozpustné testované chemikálie sa vo forme roztokov v organických rozpúšťadlách vstreknú do prázdnych fliaš pomocou mikrostriekačky tak, aby vznikli série replikátov všetkých piatich koncentrácií testovanej chemikálie. Rozpúšťadlo sa odparí prúdom plynného dusíka po povrchu roztoku v testovacích fľašiach. Alternatívne je možné pridať nerozpustné tuhé chemikálie ako odvážené množstvá tuhej látky priamo do testovacích fliaš.

27. Ak sa vo vode nerozpustné alebo slabo rozpustné kvapalné testované chemikálie nepridávajú pomocou rozpúšťadla, pridajú sa priamo mikrostriekačkou do testovacích fliaš po vložení inokula a testovacieho substrátu (pozri bod 30). Prchavé testované chemikálie sa môžu pridávať rovnakým spôsobom.

Pridanie inokula a substrátu

28. Do 5 litrovej fľaši [bod 12 písm. g)], do ktorej prúdi plynný dusík, sa zamieša primeraný objem preosiateho vyhnívajúceho kalu (pozri bod 16). Testovacími fľašami obsahujúcimi vodné roztoky alebo odparené roztoky testovaných chemikálií s rozpúšťadlami sa nechá prúdiť plynný dusík približne dve minúty, aby sa odstránil prítomný vzduch. Alikvotné množstvo, napríklad 100 ml, dobre premiešaného kalu sa vloží do testovacích fliaš pomocou pipety so širokým hrotom alebo do odmerného valca. Je nevyhnutné naplniť pipetu naraz presným požadovaným objemom kalu, vzhľadom na ľahké usadzovanie tuhých látok v kale. Ak sa naberie viac, je potrebné vyprázdniť pipetu a začať odznova.

29. Následne sa do zmesi pridá dostatočné množstvo substrátového roztoku (bod 17), aby sa získala koncentrácia 2 g/l jednotlivých živín, výťažok z kvasníc a D-glukóza, pričom dusík naďalej prúdi. Toto je príklad testovacej série.

Konečná hmotnostná koncentrácia testovanej chemikálie v testovacích fľašiach (mg/l)	Objem testovanej chemikálie (ml)		Reagenty a médiá (ml)		
	Zásobný roztok a) 10 g/l bod 18	Zásobný roztok b) 1 g/l bod 18	Riedenie vodou bod 14	Inokulum bod 16	Substrát bod 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

Celkový objem fľaše = 160 ml. Objem kvapaliny = 103 ml.

Objemu plynu = 57 ml alebo 35,6 % celkového objemu.

30. Podobne aj v prípade akejkoľvek prchavej a nerozpustnej kvapalnej testovanej chemikálie (pozri bod 27) sa dostatok prázdnych testovacích fliaš ošetrí prúdiacim plynným dusíkom.

Kontrolné vzorky a referenčná chemikália

31. Pripravia sa najmenej tri súbory fliaš obsahujúcich iba kal a substrát, ktoré slúžia ako kontrolné vzorky. Pripravia sa aj ďalšie paralelné fľaše obsahujúce kal a substrát a tiež dostatočné množstvo zásobného roztoku referenčnej chemikálie, 3,5-dichlórfenolu (bod 21), aby bola výsledkom konečná koncentrácia 150 mg/l. Táto koncentrácia by mala inhibovať produkciu plynu približne o 50 %. Alternatívne sa pripraví séria koncentrácií referenčnej chemikálie. Okrem toho sa pripravia štyri osobitné fľaše na meranie pH, ktoré obsahujú kal, odkysličenú vodu a substrát. Do dvoch fliaš sa pridá testovaná chemikália s najvyššou koncentráciou, aká sa testuje, a do zostávajúcich dvoch fliaš sa pridá odkysličená voda.

32. Je potrebné zabezpečiť, aby všetky fľaše, s testovanou a referenčnou chemikáliou, ako aj s kontrolnými vzorkami, obsahovali rovnaký objem (V_R) kvapaliny. V prípade potreby sa na dosiahnutie tohto objemu do fľaše pridá odkysličená deionizovaná voda (bod 14). Uzavretý priestor nad kvapalinou by mal predstavovať 10 – 40 % objemu fľaše, pričom jeho skutočná hodnota sa vyberie z údajov získaných v rámci predbežného testu. Po pridaní všetkých zložiek do fliaš sa odstráni ihla, cez ktorú sa dodával plyn, a každá fľaša sa utesní gumovou zátkou a hliníkovým uzáverom [bod 12 písm. b)], pričom zátka sa zvlhčí kvapkou deionizovanej vody. Obsah každej fľaše sa premieša pretrepaním.

Inkubácia fliaš

33. Fľaše sa presunú do termostaticky regulovaného inkubátora, podľa možnosti vybaveného trepacím zariadením, s udržiavanou teplotou 35 °C ± 2 °C. Fľaše sa nechajú inkubovať v tme. Po približne jednej hodine sa vyrovná tlak vo fľašiach s atmosférickým tlakom tak, že sa injekčnou ihlou pripojenou k tlakomeru [bod 12 písm. c)] prepichne zátka každej fľaše, otvorí sa ventil, až kým tlakomer neukazuje nulu, a napokon sa ventil uzavrie. Ihla by sa mala zapichnúť pod uhlom približne 45°, aby sa zabránilo úniku plynu z fliaš. Ak sú fľaše inkubované v inkubátore bez trepacieho zariadenia, je potrebné ich ručne pretrepať dvakrát za deň počas celého inkubačného času na vyváženie systému. Obsah fliaš sa potom odstráni a zostávajúce fľaše sa ďalej inkubujú v tme. Prevrátenie však nie je vhodné v prípadoch, keď nerozpustné testované chemikálie môžu priľnúť ku dnu banky.

Meranie tlaku

34. Keď fľaše dosiahnu teplotu 35 °C ± 2 °C, odmeria a zaznamená sa pH obsahu dvoch zo štyroch fliaš pripravených na tento účel. Obsah fliaš sa potom odstráni a zostávajúce fľaše sa ďalej inkubujú v tme. Počas nasledujúcich 48 – 72 hodín sa dvakrát denne odmeria a zaznamená tlak vo fľašiach tak, že sa ihlou tlakomeru prepichne zátka každej fľaše, pričom ihla sa medzi meraniami vysuší. Všetky časti fľaše treba počas merania udržiavať na inkubačnej teplote a meranie by sa malo vykonať čo najrýchlejšie. Meranú hodnotu tlaku je potrebné nechať stabilizovať a potom ju zaznamenať. Následne sa otvorí ventil a opäť uzavrie, keď hodnota tlaku klesne na nulu. Test pokračuje zvyčajne 48 hodín od okamihu prvého vyrovnávania tlaku, ktorý sa označuje ako ‚čas 0'. Počet meraní a vyrovnávaní tlaku v prípade prchavých chemikálií by mal byť obmedzený na jedno (na konci inkubácie) alebo dve, aby sa minimalizovali straty testovanej chemikálie (10).

35. Ak je nameraná hodnota tlaku záporná, ventil sa neotvorí. V injekčnej ihle a hadičke sa niekedy hromadí vlhkosť, čo sa prejaví nízkou zápornou hodnotou tlaku. V takom prípade sa odoberie ihla, hadička sa potrasie a vysuší utierkou a nasadí sa nová ihla.

Meranie pH

36. Po záverečnom meraní tlaku sa odmeria a zaznamená hodnota pH obsahu každej fľaše.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Interpretácia výsledkov

37. Vypočíta sa suma a priemer zaznamenaných hodnôt tlaku v každom časovom intervale pre každý súbor paralelných fliaš a vypočíta sa stredná kumulovaná hrubá hodnota tlaku plynu v každom časovom intervale pre každý súbor replikátov. Zostroja sa krivky časovej závislosti strednej kumulatívnej produkcie plynu (v Pa) pre kontrolné, testovacie a referenčné fľaše. Na lineárnej časti krivky sa vyberie čas, zvyčajne 48 hodín, a pre každú koncentráciu sa vypočíta percentuálna hodnota inhibície (I) z rovnice [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \qquad [1],$$

kde

I percentuálna inhibícia v %,

P_t tlak plynu vyprodukovaného s testovaným materiálom za zvolený čas v pascaloch (Pa),

P_c tlak plynu vyprodukovaného v kontrolnej vzorke za rovnaký čas v pascaloch (Pa).

Bolo by vhodné vypracovať obidva diagramy, t. j. diagram závislosti inhibície (I) od koncentrácie, ako aj od logaritmu koncentrácie tak, aby bolo možné vybrať krivku, ktorá má bližšie k linearite. Hodnota EC_{50} (mg/l) sa stanoví vizuálne alebo pomocou regresnej analýzy z krivky, ktorá má bližšie k linearite. Na porovnávacie účely môže byť užitočnejšie vyjadriť koncentráciu chemikálie v mg chemikálie/g celkovej sušiny. Táto koncentrácia sa vypočíta ako podiel objemovej koncentrácie (mg/l) a objemovej koncentrácie tuhých častíc sušiny kalu (g/l) (bod 16).

38. Vypočíta sa buď percentuálna hodnota inhibície dosiahnutá jednou koncentráciou použitej referenčnej chemikálie, alebo hodnota EC_{50}, ak sa skúmal dostatočný počet koncentrácií.

39. Stredná hodnota tlaku plynu vyprodukovaného v kontrolnej vzorke P_c (Pa) sa prevedie na objem na základe kalibračnej krivky tlakomeru (dodatok 2) a z toho sa vypočíta výťažok plynu, vyjadrený ako objem vyprodukovaný v priebehu 48 hodín zo 100 ml nezriedeného kalu pri koncentrácii tuhých látok 2 % (20 g/l) až 4 % (40 g/l).

Kritériá platnosti

40. Z výsledkov medzilaboratórnej skúšky ISO (5) vyplynulo, že referenčná chemikália (3,5-dichlórfenol) spôsobila 50 % inhibíciu produkcie plynu v rozsahu koncentrácií 32 – 510 mg/l, pričom stredná hodnota je 153 mg/l (bod 10). Tento rozsah je taký široký, že nie je možné spoľahlivo určiť pevné hranice inhibície ako kritériá platnosti. To by bolo možné, ak by ďalší vývoj ukázal, ako vyprodukovať konzistentnejšie inokulum. Objemy plynu vyprodukovaného v kontrolných fľašiach v priebehu 48 hodín sa pohybovali od 21 ml/g sušiny kalu do 149 ml/g sušiny kalu (stredná hodnota 72 ml/g). Neexistuje žiadny zjavný vzťah medzi objemom vyprodukovaného plynu a zodpovedajúcou hodnotou EC_{50}. Konečná hodnota pH sa pohybovala od 6,1 do 7,5.

41. Test sa považuje za platný, ak sa dosiahne inhibícia vyššia ako 20 % v referenčnej kontrolnej vzorke obsahujúcej 150 mg/l 3,5-dichlórfenolu, v kontrolnej slepej vzorke sa vyprodukuje viac ako 50 ml plynu na gram sušiny a hodnota pH na konci testu je v rozsahu 6,2 – 7,5.

Protokol o skúške

42. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štrukturálny vzorec a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— čistota (nečistoty) testovanej chemikálie.

Podmienky testu

— objem kvapalného obsahu a uzavretého priestoru nad kvapalinou v testovacích nádobách,

— opis testovacích nádob a merania plynu (napr. typ tlakomeru),

— aplikácia testovanej chemikálie a referenčnej chemikálie do testovacieho systému, použité testovacie koncentrácie a použitie akýchkoľvek rozpúšťadiel,

— údaje o použitom inokule: názov čistiarne odpadových vôd, opis zdroja čistenej odpadovej vody (napr. prevádzková teplota, retenčný čas kalu, informácia, či prevažujú odpadové vody z domácností alebo priemyselné odpadové vody atď.), koncentrácia tuhých látok, činnosť produkcie plynu v anaeróbnej vyhnívacej nádrži, predchádzajúca expozícia alebo možná predbežná adaptácia na toxické chemikálie, alebo miesto odberu kalu, sedimentu atď.,

— teplota a rozsah inkubácie,

— počet replikátov.

Výsledky

— hodnoty pH na konci testu,

— všetky zhromaždené namerané údaje z testovacích nádob, slepých kontrolných nádob a kontrolných nádob s referenčnou chemikáliou, v prípade potreby v tabuľkovej forme (napr. tlak v Pa alebo milibaroch),

— percentuálna inhibícia v testovacích a referenčných fľašiach a krivky závislosti inhibície od koncentrácie,

— vypočítané hodnoty EC_{50}, vyjadrené v mg/l a mg/g,

— produkcia plynu na gram kalu za 48 hodín,

— dôvody na akékoľvek odmietnutie výsledkov testu,

— diskusia o výsledkoch vrátane odchýlok od postupov v rámci tejto testovacej metódy a diskusia o akýchkoľvek odchýlkach od očakávaných výsledkov testu v dôsledku interferencií a chýb;

— uvedie sa tiež, či účelom testu bolo meranie toxicity na mikroorganizmy, ktoré už boli vystavené alebo ktoré ešte neboli vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie.

LITERATÚRA

1. Chapter C.11 of this Annex: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test.

2. Chapter C.43 of this Annex: Anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge: method by measurement of gas production.

3. International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.

4. International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.

5. ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

6. Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58-70.

7. HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

8. Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

9. Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

10. Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

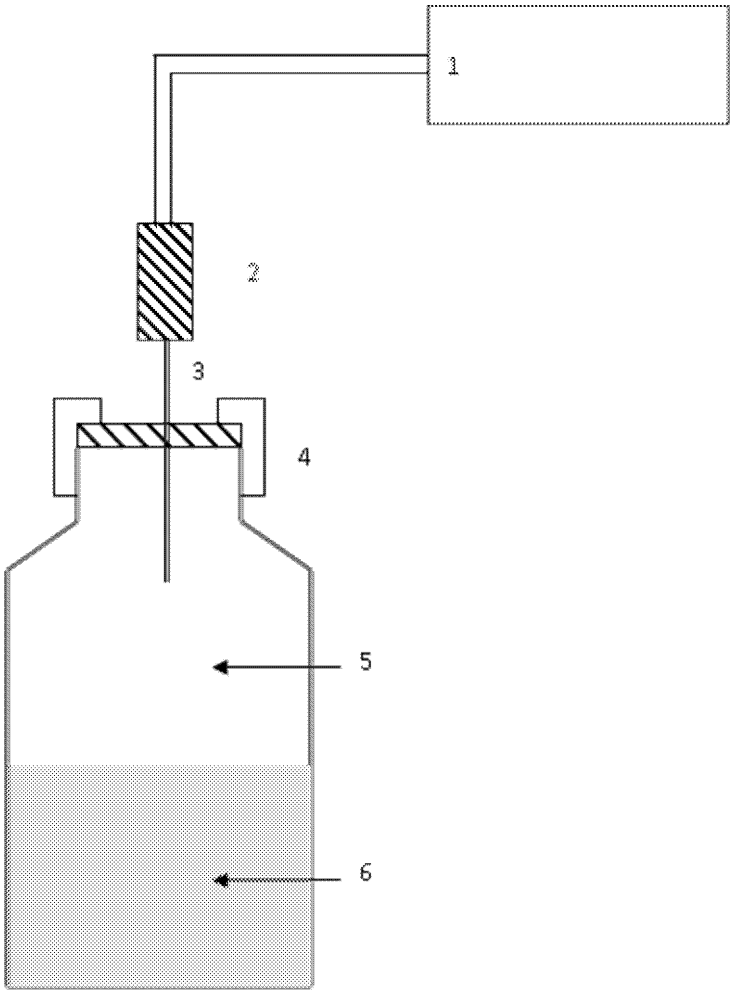
11. Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

12. International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

13. International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

Dodatok 1

Príklad zariadenia na meranie produkcie bioplynu podľa tlaku plynu



Legenda:

1 – tlakomer

2 – plynotesný trojcestný ventil

3 – injekčná ihla

4 – plynotesný uzáver (tesniaci uzáver a priehradka)

5 – uzavretý priestor nad kvapalinou

6 – inokulum vyhnívajúceho kalu

Testovacie nádoby v prostredí s teplotou 35 °C ± 2 °C.

Dodatok 2

Konverzia tlakomera

Údaje tlakomeru sa môžu pomocou štandardnej krivky dať do vzťahu s objemom plynu a z toho sa môže vypočítať objem vyprodukovaného plynu na gram sušiny kalu za 48 hodín. Tento index aktivity sa použije ako jedno z kritérií, ktorými sa zhodnotí platnosť výsledkov testu. Kalibračná krivka sa vypracuje vstreknutím známeho množstva plynu pri teplote 35 °C ± 2 °C do sérových fliaš, ktoré obsahujú rovnaký objem vody, ako je objem reakčnej zmesi (V_R).

— Alikvotné množstvo vody V_R (ml) udržiavanej pri teplote 35 °C ± 2 °C sa rozdelí do piatich sérových fliaš. Fľaše sa pevne uzavrú a na 1 hodinu umiestnia do vodného kúpeľa s teplotou 35 °C ± 2 °C, aby sa systém dostal do rovnováhy.

— Zapne sa tlakomer, nechá sa stabilizovať a nastaví sa na nulu.

— Injekčnou ihlou sa prepichne zátka jednej z fliaš, otvorí sa ventil, až kým tlakomer neukáže nulovú hodnotu, potom sa ventil uzavrie.

— Postup sa opakuje so zostávajúcimi fľašami.

— Do každej fľaše sa vstrekne 1 ml vzduchu s teplotou 35 °C ± 2 °C. Ihlou (tlakomera) sa prepichne zátka jednej z fliaš a nechá sa stabilizovať meraná hodnota tlaku. Hodnota tlaku sa zaznamená, otvorí sa ventil, až kým tlakomer neukáže nulovú hodnotu, potom sa ventil uzavrie.

— Postup sa opakuje so zostávajúcimi fľašami.

— Celý postup sa opakuje s použitím 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml a 50 ml vzduchu.

— Zostrojí sa konverzná krivka závislosti tlaku (Pa) od objemu vstreknutého plynu (ml). Reakcia zariadenia je lineárna v rozsahu 0 – 70 000 Pa a 0 – 50 ml vyprodukovaného plynu.

Dodatok 3

Známe faktory, ktoré môžu viesť k nesprávnym výsledkom

a) *Kvalita uzáverov fliaš*

Rozličné typy priehradiek pre sérové fľaše sú komerčne dostupné, mnohé z nich vrátane butylkaučukových však strácajú tesnosť, keď sa prepichnú ihlou podľa podmienok testu. Niekedy dochádza po prepichnutí priehradky injekčnou ihlou k veľmi pomalému poklesu tlaku. S cieľom predísť únikom plynu sa odporúča používať plynotesné priehradky [bod 12 písm. b)].

b) *Vlhkosť v injekčnej ihle*

V injekčnej ihle a hadičke sa niekedy hromadí vlhkosť, čo sa prejaví nízkou zápornou hodnotou tlaku. Napraví sa to tak, že sa odoberie ihla, hadička sa potrasie a vysuší utierkou a nasadí sa nová ihla [body 12 písm. c) a 35].

c) *Kontaminácia kyslíkom*

Anaeróbne metódy sú náchylné na chyby spôsobené kontamináciou kyslíkom, čo môže spôsobiť nižšiu produkciu plynu. V rámci tejto metódy by sa takáto možnosť mala minimalizovať pomocou prísne anaeróbnych techník vrátane používania odkladacej schránky.

d) *Hrubé substráty v kale*

Anaeróbnu produkciu plynu a citlivosť kalu ovplyvňujú substráty, ktoré sa prenášajú s inokulom do testovacích fliaš. Vyhnívajúci kal z domových anaeróbnych vyhnívacích nádrží často obsahuje rozpoznateľný materiál ako chlpy a celulózové zvyšky rastlín, ktoré majú tendenciu sťažovať získavanie reprezentatívnych vzoriek. Preosiatím kalu je možné odstrániť hrubé nerozpustné látky, čo zvyšuje pravdepodobnosť odberu reprezentatívnych vzoriek (bod 16).

e) *Prchavé testované chemikálie*

Prchavé testované chemikálie sa uvoľnia do uzavretého priestoru nad kvapalinou v testovacích fľašiach. To môže viesť k určitej strate testovaného materiálu zo systému počas ventilácie po meraniach tlaku, čím by sa získali nepravdivo vysoké hodnoty koncentrácie EC_{50}. Chybu je možné znížiť vhodným výberom pomeru objemu uzavretého priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny a vynechaním ventilácie po vykonaní merania tlaku (10).

f) *Nelinearita produkcie plynu*

Ak krivka závislosti strednej kumulatívnej produkcie plynu od času inkubácie nie je za 48-hodinové obdobie približne lineárna, presnosť testovania sa môže znížiť. Na prekonanie tejto skutočnosti sa odporúča použiť vyhnívajúci kal z iného zdroja a/alebo zvýšiť koncentráciu testovacieho substrátu živín, výťažku z kvasníc a glukózy (bod 29).

Dodatok 4

Aplikácia na environmentálne vzorky s nízkou koncentráciou biomasy – anaeróbnych kalov, sedimentov atď.

ÚVOD

A.1 Vo všeobecnosti je špecifická mikrobiálna aktivita (objem plynu vyprodukovaného na gram sušiny) prirodzene sa vyskytujúcich anaeróbnych kalov, sedimentov, pôd atď. oveľa nižšia ako aktivita anaeróbneho kalu získaného z odpadových vôd. Z tohto dôvodu, ak sa majú merať inhibičné účinky chemikálií na tieto menej aktívne vzorky, musia sa upraviť niektoré experimentálne podmienky. V prípade týchto menej aktívnych vzoriek sú možné dva všeobecné postupy:

a) vykoná sa upravená predbežná skúška (bod 25) s nezriedenou vzorkou kalu, pôdy atď. pri teplote 35 °C ± 2 °C alebo pri teplote, aká bola na mieste odberu vzorky, čím sa dosiahne presnejšia simulácia (ako v časti 1 normy ISO 13 641);

b) alebo sa vykoná test so zriedeným (1: 100) kalom z vyhnívacej nádrže, čím sa simuluje nízka aktivita, ktorá sa očakáva od environmentálnej vzorky, pričom teplota sa udržiava na hodnote 35 °C ± 2 °C (ako v časti 2 normy ISO 13 641).

A.2 Možnosť a) je možné realizovať pomocou tu opísanej metódy (rovnocennej s metódou uvedenou v časti 1 normy ISO 13 641), ale je nevyhnutné vykonať predbežnú skúšku (bod 25), aby sa zabezpečili optimálne podmienky, pokiaľ už nie sú známe z predchádzajúceho testovania. Vzorka kalu alebo sedimentu by sa mala dôkladne premiešať, napríklad v miešadle, a v prípade potreby zriediť malým množstvom odvzdušnenej vody (bod 14) tak, aby bola dostatočne mobilná na premiestnenie pomocou pipety so širokým hrotom alebo odmerného valca. Ak sa množstvo živín považuje za nedostatočné, vzorka sa môže odstrediť (za anaeróbnych podmienok) a opätovne suspendovať v minerálnom médiu, ktoré obsahuje výťažok z kvasníc (A.11).

A.3 Možnosť b) primerane imituje nízku aktivitu environmentálnych vzoriek, ale koncentrácia suspendovaných tuhých látok prítomných v týchto vzorkách nie je vysoká. Úloha týchto tuhých látok v inhibícii nie je známa, ale je možné, že výsledkom reakcie testovaných chemikálií a zložiek kalu, ako aj adsorpcie testovaných chemikálií na tuhé látky, by mohlo byť zníženie toxicity testovanej chemikálie.

A.4 Ďalším dôležitým faktorom je teplota: v rámci prísnej simulácie by sa testy mali vykonávať pri teplote, aká bola na mieste odberu vzorky, keďže o rôznych skupinách baktérií produkujúcich metán je známe, že sú aktívne v rozličných teplotných rozsahoch, konkrétne termofily (~ 30 – 35 °C), mezofily (20 – 25 °C) a psychrofily (< 20 °C), ktoré môžu vykazovať rôzne inhibičné vlastnosti.

A.5 Trvanie: v rámci všeobecného testu bola v časti 1, s použitím nezriedeného kalu, produkcia plynu v trvaní 2 až 4 dni vždy dostatočná, zatiaľ čo v časti 2 s použitím stokrát zriedeného kalu sa za tento čas v rámci medzilaboratórnej porovnávacej skúšky nevyprodukoval dostatok plynu, ak vôbec nejaký. Madsen a kol. (1996) pri opise tohto druhého testu uvádzajú, že k dispozícii by malo byť najmenej sedem dní.

Testovanie s nízkou koncentráciou biomasy (možnosť b)

Vykonať by sa mali tieto zmeny, ktorými sa dopĺňajú alebo nahrádzajú niektoré existujúce body a podbody hlavného textu.

A.6 K bodu 6 sa dopĺňa: Princíp skúšky:

‚Táto technika sa môže používať s anaeróbnym kalom zriedeným v pomere 1: 100, čiastočne na simuláciu nízkej aktivity kalov a sedimentov. Inkubačná teplota môže byť buď 35 °C, alebo rovnaká, aká bola na mieste odberu vzorky. Keďže bakteriálna aktivita je oveľa nižšia ako v nezriedenom kale, inkubačný čas by sa mal predĺžiť najmenej na sedem dní.‘

A.7 K bodu 12 a) sa dopĺňa:

‚inkubátor by mal byť schopný prevádzky až do teploty 15 °C.‘

A.8 Za bod 13 sa dopĺňa ďalší reagent:

‚kyselina fosforečná (H_3PO_4) 85 % hmotnosti vo vode.'

A.9 Na koniec bodu 16 sa dopĺňa:

‚V rámci testu sa použije konečná koncentrácia 0,20 g/l ± 0,05 g/l celkovej sušiny.'

A.10 Bod 17: Testovací substrát

Tento substrát sa nepoužije, ale nahradí sa výťažkom z kvasníc (pozri body 17, A.11, A.12, A.13).

A.11 Na zriedenie anaeróbneho kalu je potrebné minerálne médium vrátane stopových prvkov a na zjednodušenie sa do tohto média pridá organický substrát, výťažok z kvasníc.

Za bod 17 sa dopĺňa:

‚a) Testovacie minerálne médium s výťažkom z kvasníc

Pripravuje sa z desaťnásobne koncentrovaného testovacieho média [bod 17 písm. b), A.12], s roztokom stopového prvku [bod 17 písm. c), A.13]. Použije sa čerstvo dodaný nonahydrát sulfidu sodného [bod 17 písm. b), A.12], alebo sa pred použitím prepláchne a vysuší, aby sa zabezpečilo, že bude mať dostatočnú redukčnú kapacitu. Ak sa test vykonáva bez použitia odkladacej schránky [bod 17 písm. j)], koncentrácia sulfidu sodného v zásobnom roztoku by sa mala zvýšiť na 2 g/l (z hodnoty 1 g/l). Sulfid sodný sa môže pridávať aj z vhodného zásobného roztoku cez priehradku uzavretých testovacích fliaš, keďže tento postup znižuje riziko oxidácie, až do dosiahnutia konečnej koncentrácie 0,2 g/l. Alternatívne sa môže použiť titánium-citrát [bod 17 písm. b)]. Pridáva sa cez priehradku uzavretých testovacích fliaš, aby sa dosiahla koncentrácia 0,8 – 1,0 mmol/l. Titánium-citrát je vysokoúčinné a málo toxické redukčné činidlo, ktoré sa pripraví takto: rozpustí sa 2,94 g dihydrátu citrátu trisodného v 50 ml odkysličenej vody (bod 14) (čoho výsledkom je roztok 200 mmol/l) a pridá sa 5 ml roztoku titánium-chlorátu (15 g/100 ml vody). Činidlo sa pomocou uhličitanu sodného neutralizuje na pH 7 ± 0,5 a do vhodnej sérovej fľaše sa naleje v prúde plynného dusíka. Koncentrácia titánium-citrátu v tomto zásobnom roztoku je 164 mmol/l. Testovacie médium sa má použiť okamžite alebo skladovať pri teplote 4 °C najdlhšie 1 deň.

A.12 b) Desaťnásobne koncentrované testovacie médium sa pripraví z týchto zložiek:

bezvodý dihydrogénfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	2,7 g
hydrogénfosforečnan disodný (Na_2HPO_4)	4,4 g
(alebo 11,2 g dodekahydrátu)	5,3 g
chlorid amónny (NH_4Cl)	
dihydrát chloridu vápenatého ($CaC1_2$ $2H_2O$)	0,75 g
hexahydrát chloridu horečnatého ($MgCl_2$ $6H_2O$)	1,0 g
tetrahydrát chloridu železnatého ($FeCl_2$ $4H_2O$)	0,2 g
resazurín (oxidačno-redukčný indikátor)	0,01 g
nonahydrát sulfidu sodného (Na_2S $9H_2O$)	1,0 g
(alebo titánium-citrát) konečná koncentrácia	0.8 mmol/l až 1.0 mmol/l
roztok stopových prvkov [pozri bod 17 písm. c), A.13]	10,0 ml
výťažok z kvasníc	100 g
rozpustí sa vo vode (bod 14) a doplní sa do:	1 000 ml

A.13 c) Roztok stopových prvkov sa pripraví z týchto zložiek:

tetrahydrát chloridu mangánatého ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
kyselina boritá (H_3BO_3)	0,05 g

chlorid zinočnatý ($ZnCl_2$)	0,05 g
chlorid meďnatý ($CuCl_2$)	0,03 g
dihydrát molybdénanu sodného ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
hexahydrát chloridu kobaltnatého ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
hexahydrát chloridu nikelnatého ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
seleničitan sodný (Na_2SeO_3)	0,05 g
rozpustí sa vo vode (bod 14) a doplní sa do:	1 000 ml‘

A.14 Bod 25: Predbežná skúška

Je dôležité, aby sa predbežná skúška vykonala tak, ako je opísané v bode 24, s výnimkou toho, že koncentrácia tuhých látok v kale by mala predstavovať jednu stotinu uvedenej hodnoty, teda 0,1 g/l, 0,2 g/l a 0,4 g/l. Inkubácia by mala trvať najmenej 7 dní.

Poznámka: V rámci medzilaboratórnej porovnávacej skúšky (5) bol objem uzavretého priestoru nad kvapalinou príliš veľký – až 75 % celkového objemu. Táto hodnota by mala byť v odporúčanom rozsahu od 10 do 40 %. Dôležitým kritériom je, že objem plynu vyprodukovaného pri inhibícii približne 80 % by mal byť merateľný s prijateľnou presnosťou (napr. ± 5 % až ± 10 %).

A.15 Body 26 až 30: Pridanie testovanej chemikálie, inokula a substrátu

Pridávanie prebieha tým istým spôsobom, ako je uvedené v daných bodoch, ale substrátový roztok (bod 17) sa nahradí substrátom testovacieho média a výťažku z kvasníc (A.11).

Okrem toho sa konečná koncentrácia sušiny kalu znížila z 2 – 4 g/l na 0,2 g/l ± 0,05 g/l (A.9). Dva príklady pridávania zložiek testovacej zmesi sú uvedené v tabuľke A.1, ktorá nahrádza tabuľku uvedenú v bode 29.

A.16 Bod 33: Inkubácia fliaš

Vzhľadom na očakávanú nižšiu mieru produkcie plynu sa inkubácia vykonáva najmenej 7 dní.

A.17 Bod 34: Meranie tlaku

Na meranie tlaku v uzavretom priestore nad kvapalinou vo fľašiach sa používa rovnaký postup, ako je opísané v bode 34, ak je potrebné zistiť množstvá v plynnej fáze. Ak sa má merať celkové množstvo CO_2 a CH_4, pH kvapalnej fázy sa zníži približne na hodnotu 2 vstreknutím H_3PO_4 do každej príslušnej fľaše, pričom sa tlak meria po 30-minútovom pretrepávaní pri testovacej teplote. Viac informácií o kvalite inokula je však možné získať meraním tlaku v každej fľaši pred okyslením a po ňom. Napríklad ak je miera produkcie CO_2 oveľa vyššia ako miera produkcie metánu, citlivosť fermentatívnych baktérií sa môže zmeniť a/alebo testovaná chemikália v prvom rade ovplyvní metanogénne baktérie.

A.18 Bod 36: Meranie pH

Ak sa má použiť H_3PO_4, je potrebné pripraviť ďalšie fľaše, do ktorých sa H_3PO_4 nepridá, zvlášť ak sa má merať pH.

LITERATÚRA:

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

Tabuľka A.1.

Príklady nastavenia pre testovacie dávky

Zložky reakčnej zmesi	Príklad 1	Príklad 2	Bežné poradie pridávania
Koncentrácia pripraveného inokula (g/l)	0,42	2,1	—
Objem pridaného inokula (ml)	45	9	4
Koncentrácia inokula v testovacích fľašiach (g/l)	0,20	0,20	—
Objem pridaného testovacieho média (ml)	9	9	2
Objem vody pridanej na riedenie (ml)	36	72	3
Koncentrácia výťažku z kvasníc v testovacích fľašiach (g/l)	9,7	9,7	—
Objem zásobného roztoku testovanej chemikálie (ml)	3	3	1
Celkový objem kvapaliny (ml)	93	93	—

Dodatok 5

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používa toto vymedzenie pojmov:

Chemikália je látka alebo zmes.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

C.35 TEST TOXICITY PRE ČERVY RODU *LUMBRICULUS* V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENÉHO SEDIMENTU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 225 (2007). Endobentózne organizmy, ktoré sa živia sedimentmi, sú potenciálne vystavené silnému pôsobeniu chemikálií naviazaných na sedimenty, a preto by sa im mala venovať zvýšená pozornosť, napr. (1), (2), (3). Medzi takýmito živočíchmi zohrávajú dôležitú úlohu vodné máloštetinavce (trieda *Oligochaeta*) v sedimentoch vodných systémov. Tieto živočíchy svojou bioturbáciou sedimentu a tým, že slúžia ako korisť, môžu mať silný vplyv na biologickú dostupnosť takýchto chemikálií pre iné organizmy, napr. ryby, ktoré sa živia bentosom. Na rozdiel od epibentóznych organizmov sa endobentózne vodné máloštetinavce (napr. dážďovička pestrá, *Lumbriculus variegatus*) zahrabávajú do sedimentu a živia sa časticami sedimentu pod jeho povrchom. Tým je zabezpečené, že testované organizmy sú vystavené pôsobeniu testovaných chemikálií všetkými možnými spôsobmi (napr. dotykom s kontaminovanými časticami usadenín a ich požitím, ale aj prostredníctvom vody v póroch sedimentov a nadložnej vody).

2. Táto testovacia metóda bola vypracovaná s cieľom posúdiť účinky dlhodobého pôsobenia chemikálií naviazaných na sedimenty na endobentózne máloštetinavce druhu *Lumbriculus variegatus* (Müller). Vychádza z existujúcich protokolov testu toxicity a bioakumulácie v sedimente, napr. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Metóda je opísaná pre statické podmienky testu. Expozičným scenárom použitým v rámci tejto testovacej metódy je obohacovanie sedimentu testovanou chemikáliou. Použitie obohateného sedimentu je určené na simuláciu prípadu sedimentu kontaminovaného testovanou chemikáliou.

3. Chemikálie, ktoré je potrebné testovať na organizmoch žijúcich v sedimente, zvyčajne pretrvajú v tomto prostredí dlhý čas. Organizmy žijúce v sedimente môžu byť exponované viacerými spôsobmi. Relatívny význam každého spôsobu expozície a časové obdobie, v ktorom sa každý z nich podieľa na celkových toxických účinkoch, závisí od fyzikálno-chemických vlastností danej chemikálie a jej konečného osudu v tele živočícha. V prípade silno adsorbujúcich chemikálií (napr. s hodnotou log K_{ow} > 5) alebo chemikálií, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, môže byť významným spôsobom expozície prijímanie kontaminovanej potravy. S cieľom vyhnúť sa podhodnoteniu toxicity takých chemikálií sa potrava potrebná na reprodukciu a rast testovaných organizmov pridá do sedimentu pred aplikáciou testovanej chemikálie (11). Opísaná testovacia metóda je dostatočne podrobná, aby test bolo možné vykonať s možnosťou úprav experimentálnej koncepcie v závislosti od podmienok v jednotlivých laboratóriách a od rôznych vlastností testovaných chemikálií.

4. Testovacia metóda je zameraná na stanovenie účinkov testovanej chemikálie na reprodukciu a biomasu testovaných organizmov. Meranými biologickými parametrami sú celkový počet prežívajúcich červov a množstvo biomasy (suchá hmotnosť) na konci expozície. Tieto údaje sa analyzujú buď prostredníctvom regresného modelu na odhadnutie koncentrácie, ktorá by spôsobila účinok x % (napr. EC_{50}, EC_{25} a EC_{10}), alebo prostredníctvom testovania štatistickej hypotézy na stanovenie koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC) a najnižšej koncentrácie s pozorovaným účinkom (LOEC).

5. V kapitole C.27 tejto prílohy, ‚Test toxicity *Chironomidae* v systéme sediment – voda za použitia obohateného sedimentu' (6), je uvedených mnoho základných a užitočných informácií týkajúcich sa postupu metódy testovania toxicity v sedimente. Tento dokument teda slúži ako základ pre vypracované úpravy potrebné na vykonávanie testov toxicity v sedimente s máloštetinavcami druhu *Lumbriculus variegatus*. Medzi ďalšie použité dokumenty patria napríklad štandardná príručka ASTM na stanovenie bioakumulácie kontaminantov naviazaných na sedimenty bentóznymi bezstavovcami (3), metódy US EPA na meranie toxicity a bioakumulácie kontaminantov naviazaných na sedimenty sladkovodnými bezstavovcami (7) a štandardná príručka ASTM na zber, uchovávanie, charakterizáciu a manipuláciu sedimentov na toxikologické testovanie a na výber vzoriek pri zbere bentóznych bezstavovcov (12). Okrem toho sú dôležitým zdrojom informácií na vypracovanie tohto dokumentu praktické skúsenosti získané počas medzilaboratórnej porovnávacej skúške testovacej metódy [(13), protokol o medzilaboratórnej porovnávacej skúške] a údaje z literatúry.

ZÁKLADNÉ A USMERŇUJÚCE INFORMÁCIE

6. Informácie o testovanej chemikálii, ako sú bezpečnostné opatrenia, vhodné podmienky skladovania a analytické metódy, je potrebné získať pred začiatkom štúdie. Usmernenia týkajúce sa fyzikálno-chemických vlastností testovaných chemikálií, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v literatúre pod číslom (14).

7. Pred vykonaním testu by mali byť známe tieto informácie o testovanej chemikálii:

— bežný názov, chemický názov (podľa možnosti názov IUPAC), štrukturálny vzorec, registračné číslo CAS, čistota,

— tlak pary,

— rozpustnosť vo vode.

8. Za užitočné pred začiatkom testu sa považujú tieto doplňujúce informácie:

— rozdeľovacia konštanta oktanol – voda, K_{ow},

— rozdeľovacia konštanta organický uhlík – voda, vyjadrený ako K_{oc},

— hydrolýza,

— fototransformácia vo vode,

— biodegradovateľnosť,

— povrchové napätie.

9. Pred začiatkom testu by sa mali získať informácie o určitých vlastnostiach sedimentu (7). Podrobnosti sú uvedené v bodoch 22 až 25.

PRINCÍP TESTU

10. Červy v podobnom fyziologickom stave (synchronizované, ako je opísané v dodatku 5), sa vystavia pôsobeniu série koncentrácií toxickej chemikálie, aplikovanej na fázu sedimentu v systéme sediment – voda. Ako médium by sa mal použiť umelý sediment a rekonštituovaná voda. Testovacie nádoby bez pridania testovacej chemikálie slúžia ako kontrolné vzorky. Sediment sa obohatí o testovanú chemikáliu hromadne pre každú úroveň koncentrácie s cieľom minimalizovať variabilitu medzi replikátmi každej úrovne koncentrácie. Následne sa testované organizmy umiestnia do testovacích nádob, v ktorých sú koncentrácie sedimentu a vody vyvážené (pozri bod 29). Testované živočíchy sú vystavené pôsobeniu systémov sediment – voda 28 dní. Vzhľadom na nízky obsah živín v umelom sedimente by sa mal sediment upraviť zdrojom potravy (pozri body 22 a 23 a dodatok 4), aby sa zabezpečilo, že červy budú rásť a rozmnožovať sa v rámci podmienok regulácie. Týmto spôsobom sa zabezpečí, aby boli testované živočíchy exponované účinkom vody a sedimentu, ako aj ich potravy.

11. Uprednostňovaným parametrom v rámci tohto typu štúdie je koncentrácia EC_x (napr. EC_{50}, EC_{25} a EC_{10}, účinná koncentrácia, ovplyvňujúca x % testovaných organizmov) pre reprodukciu a množstvo biomasy, v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Je však potrebné si uvedomiť, že vzhľadom na veľkú neistotu nízkej hodnoty EC_x (napr. EC_{10}, EC_{25}) s extrémne vysokými hranicami spoľahlivosti (95 %) [napr. (15)] a štatistickú významnosť vypočítanú počas testovania hypotézy sa za najpevnejší konečný parameter považuje koncentrácia EC_{50}. Okrem toho sa pre množstvo biomasy a reprodukciu môže vypočítať koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) a najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC), ak koncepcia a údaje testu podporujú tieto výpočty (pozri body 34 až 38). Účel štúdie, odvodenie koncentrácií EC_x alebo NOEC, bude závisieť od koncepcie testu.

REFERENČNÉ TESTY

12. Očakáva sa, že výsledky s kontrolnými organizmami dostatočne preukážu schopnosť laboratória vykonať test, a ak sú k dispozícii historické údaje, aj opakovateľnosť testu. Okrem toho sa môžu v pravidelných intervaloch vykonávať referenčné testy toxicity s použitím referenčnej toxickej chemikálie na posúdenie citlivosti testovaných organizmov. Citlivosť a stav testovaných živočíchov môžu uspokojivo preukázať referenčné testy toxicity iba vo vode, v trvaní 96 hodín (4) (7). Informácie o toxicite pentachlórfenolu (PCP) v úplných testoch (28-dňová expozícia v obohatenom sedimente) sú uvedené v dodatku 6 a v protokole o medzilaboratórnej porovnávacej skúške testovacej metódy (13). Akútna toxicita PCP iba vo vode je opísaná v literatúre, napr. (16). Tieto informácie sa môžu použiť na porovnanie citlivosti testovacieho organizmu v referenčných testoch s PCP ako referenčnou toxickou chemikáliou. Ako referenčné toxické chemikálie pre druh *L. variegatus* sa odporúčajú chlorid draselný (KCl) alebo síran meďnatý ($CuSO_4$) (4) (7). V súčasnosti je stanovenie kvalitatívnych kritérií založených na údajoch o toxicite pre KCl zložité z dôvodu nedostatku údajov v literatúre pre druh *L. variegatus*. Informácie o toxicite medi voči druhu *L. variegatus* je možné nájsť v bodoch (17) až (21).

PLATNOSŤ TESTU

13. Ak má byť test platný, mali by byť splnené tieto požiadavky:

— medzilaboratórna porovnávacia skúška (13) ukázala, že pre druh *Lumbriculus variegatus* by mal priemerný počet žijúcich červov v jednom replikáte kontrolnej vzorky vzrásť najmenej o faktor 1,8 na konci expozície v porovnaní s počtom červov v jednom replikáte na jej začiatku,

— hodnota pH nadložnej vody by mala byť počas testu 6 až 9,

— koncentrácia kyslíka v nadložnej vode by počas testu nemala byť nižšia ako 30 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka pri testovacej teplote.

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Testovací systém

14. Odporúčajú sa statické systémy bez obnovy nadložnej vody. Ak je pomer sedimentu a vody (pozri bod 15) vhodný, jemné prevzdušňovanie bude spravidla stačiť na udržanie kvality vody na prijateľnej úrovni pre testované organizmy (napr. na maximalizáciu hladiny rozpusteného kyslíka, minimalizáciu vzniku produktov vylučovania). Semistatické alebo prietokové systémy s prerušovaným alebo sústavným obnovovaním nadložnej vody by sa mali využívať len vo výnimočných prípadoch, keďže pravidelné obnovovanie nadložnej vody môže ovplyvniť chemickú rovnováhu (napr. straty testovanej chemikálie z testovacieho systému).

Testovacie nádoby a zariadenie

15. Expozícia by mala prebiehať v sklených kadičkách, napr. s objemom 250 ml a priemerom 6 cm. Použiť sa môžu aj iné vhodné sklené nádoby, ale mali by zaručiť primeranú hĺbku nadložnej vody a sedimentu. Do každej nádoby by sa mala vložiť vrstva 1,5 – 3 cm umelo pripraveného sedimentu. Pomer hĺbky vrstvy sedimentu a hĺbky nadložnej vody by mal byť 1: 4. Nádoby by mali mať vhodnú veľkosť, ktorá zodpovedá veľkosti náplne, t. j. počtu vložených testovaných červov pripadajúcich na jednotku hmotnosti sedimentu (pozri tiež bod 39).

16. Testovacie nádoby a ďalšie zariadenia, ktoré prídu do styku s testovacími chemikáliami, by mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo z iného chemicky inertného materiálu. Treba dbať na to, aby sa pri všetkých častiach zariadenia predišlo používaniu materiálov, ktoré sa môžu rozpúšťať, môžu absorbovať testované chemikálie alebo vylúhovať iné chemikálie a mať škodlivé účinky na testované živočíchy. Všetko zariadenie, ktoré prichádza do styku s testovacími médiami, by malo byť vyrobené z polytetrafluóretylénu, nehrdzavejúcej ocele a/alebo zo skla. V prípade organických chemikálií, o ktorých je známa ich adsorpcia na sklo, môže byť potrebné použiť posilanizované sklo. V takýchto prípadoch je potrebné zariadenia po skončení pokusu zlikvidovať.

Testované druhy

17. Testovaný druh používaný pri takomto type štúdií predstavujú sladkovodné máloštetinavce *Lumbriculus variegatus* (Müller). Tento druh je tolerantný voči širokej škále typov sedimentov a vo veľkej miere sa využíva na testovanie toxicity a bioakumulácie v sedimente [napr. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Uvádzať by sa mal pôvod testovaných živočíchov, potvrdenie identity druhu [napr. (36)], ako aj podmienky kultúry. Identifikácia druhu sa nevyžaduje pred každým testom, ak organizmy pochádzajú z internej kultúry.

Kultivácia testovaných organizmov

18. S cieľom mať dostatočný počet červov na vykonávanie testov toxicity v sedimente je vhodné uchovávať ich v stálej laboratórnej kultúre. Usmernenie pre metódy laboratórnej kultúry druhu *Lumbriculus variegatus* a zdroje štartovacích kultúr sú uvedené v dodatku 5. Podrobné informácie o kultivovaní tohto druhu sú uvedené v literatúre (3), (7), (27).

19. Na zabezpečenie toho, aby sa testy vykonávali so živočíchmi toho istého druhu, sa dôrazne odporúča vytvorenie kultúr jedného druhu. Je potrebné tiež zabezpečiť, aby kultúry a najmä červy použité v testoch boli bez zjavných chorôb a abnormalít.

Voda

20. Ako nadložnú vodu v testoch sa odporúča používať vodu rekonštituovanú podľa kapitoly C.1 tejto prílohy (37). Tá sa môže používať aj pre laboratórne kultúry červov (príprava je opísaná v dodatku 2). Ak je to potrebné, môže sa používať aj prírodná voda. Zvolená voda musí mať takú kvalitu, aby umožnila rast a reprodukciu testovaného druhu počas celého obdobia aklimatizácie a testovania bez toho, že by sa prejavil nezvyčajný vzhľad alebo správanie. Druh *Lumbriculus variegatus* preukázal schopnosť prežiť, rásť a rozmnožovať sa v tomto type vody (30) a umožňuje maximálnu štandardizáciu testovacích a kultivačných podmienok. Ak sa použije rekonštituovaná voda, je potrebné uviesť jej zloženie a pred použitím by mali byť známe prinajmenšom údaje o jej hodnote pH, obsahu kyslíka a tvrdosti (vyjadrenej v mg $CaCO_3$/l). Užitočné informácie by mohla poskytnúť analýza vody na mikropolutanty pred jej použitím (pozri napr. dodatok 3).

21. Hodnota pH nadložnej vody by mala byť v rozsahu 6,0 – 9,0 (pozri bod 13). Ak sa očakáva zvýšená produkcia amoniaku, považuje sa za užitočné udržiavať hodnotu pH v rozsahu 6,0 – 8,0. Na testovanie napríklad slabých organických kyselín je vhodné upraviť pufrovaním hodnotu pH vody, ktorá sa má používať v rámci testu, ako sa uvádza v literatúre, napr. pod číslom (16). V prípade prírodnej vody, ktorá sa má používať v rámci testu, by jej celková tvrdosť mala byť v rozsahu 90 – 300 mg $CaCO_3$ na liter. V dodatku 3 sú zhrnuté ďalšie kritériá pre vhodnú vodu na riedenie podľa usmernenia OECD č. 210 (38).

Sediment

22. Keďže nekontaminované prírodné sedimenty z konkrétneho zdroja nemusia byť k dispozícii po celý rok a autochtónne organizmy, ako aj prítomnosť mikropolutantov môžu ovplyvniť test, prednostne by sa mal používať umelo pripravený sediment (známy aj pod názvom rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment). Použitie umelo pripraveného sedimentu minimalizuje variabilitu testovacích podmienok, ako aj zavedenie autochtónnej fauny. Uvedený umelo pripravený sediment je založený na umelom sedimente podľa literatúry (6), (39) a (40). Odporúča sa na typ testov podľa literatúry (6), (10), (30), (41), (42), (43):

a) 4 – 5 % (suchá hmotnosť) rašeliny; dôležité je používať rašelinu vo forme prášku, stupeň rozkladu: ‚stredný', jemne drvenú (veľkosť častíc ≤ 0,5 mm) a sušenú iba vzduchom;

b) 20 % ± 1 % (suchá hmotnosť) kaolínovej hliny (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %);

c) 75 – 76 % (suchá hmotnosť) kremenného piesku (jemný piesok, veľkosť zrniek: ≤ 2 mm, ale > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 µm);

d) deionizovaná voda, 30 – 50 % suchej hmotnosti sedimentu, okrem zložiek suchého sedimentu;

e) uhličitan vápenatý chemicky čistej kvality ($CaCO_3$) sa pridáva, aby sa upravila hodnota pH konečnej zmesi sedimentu;

f) celkový obsah organického uhlíka (TOC) v konečnej zmesi by mal byť 2 % (± 0,5 %) suchej hmotnosti sedimentu a mal by sa upraviť pomocou primeraného množstva rašeliny a piesku podľa písmen a) a c);

g) potrava, napríklad sušené listy přhľavy dvojdomej (rod *Urtica*, v súlade s farmaceutickými normami, na ľudskú spotrebu), alebo zmes sušených listov rodu *Urtica* s alfa celulózou (1: 1), pri 0,4 – 0,5 % suchej hmotnosti sedimentu, okrem zložiek suchého sedimentu; podrobnosti sú uvedené v dodatku 4.

23. Zdroj rašeliny, kaolínovej hliny, potravy a piesku by mal byť známy. Okrem písmena g) sa aj v kapitole C.27 tejto prílohy (6) uvádzajú alternatívne rastlinné materiály, ktoré sa majú použiť ako zdroj výživy: dehydrované listy moruše (*Morus alba*), ďateliny plazivej (*Trifolium repens*), špenátu (*Spinacia oleracea*) alebo obilných tráv.

24. Zvolený zdroj potravy by sa mal pridať pred obohacovaním sedimentu testovanou chemikáliou alebo počas neho. Zvolený zdroj potravy by mal umožniť prinajmenšom prijateľnú reprodukciu v kontrolnej vzorke. Analýza umelého sedimentu alebo jeho zložiek na mikropolutanty by mohla pred použitím poskytnúť

užitočné informácie. Príklad prípravy umelo pripraveného sedimentu je opísaný v dodatku 4. Prijateľné je tiež zmiešanie suchých zložiek, ak sa preukáže, že po pridaní nadložnej vody nedochádza k oddeleniu zložiek sedimentu (napr. vyplavením častíc rašeliny) a že rašelina alebo sediment prejde dostatočným kondicionovaním (pozri tiež bod 25 a dodatok 4). V prípade umelého sedimentu by mal byť známy prinajmenšom pôvod zložiek, rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a hliny), celkový obsah organického uhlíka, obsah vody a hodnota pH. Meranie oxidačno-redukčného potenciálu je nepovinné.

25. V prípade potreby, napríklad na špecifické testovacie účely, môžu slúžiť na testovanie a/alebo kultivovanie sedimentu aj prírodné sedimenty z neznečistených lokalít (3). Ak sa však použije prírodný sediment, mal by byť známy prinajmenšom jeho pôvod (miesto odberu), hodnota pH a obsah amoniaku vo vode obsiahnutej v póroch, celkový obsah organického uhlíka a obsah dusíka, rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a hliny) a percentuálny obsah vody (7), a nemal by obsahovať žiadne kontaminanty ani iné organizmy, ktoré by mohli súperiť s testovanými organizmami alebo na nich koristiť. Meranie oxidačno-redukčného potenciálu a kapacity výmeny katiónov je nepovinné. Odporúča sa tiež, aby bol prírodný sediment pred obohatením testovanou chemikáliou na sedem dní uvedený do podmienok, ktoré budú prevládať v nasledujúcom teste. Na konci tohto obdobia kondicionovania by sa mala nadložná voda odobrať a odstrániť.

26. Sediment, ktorý sa má použiť, musí mať takú kvalitu, aby umožnil prežívanie a reprodukciu organizmov v kontrolných vzorkách počas trvania expozície bez toho, že by sa prejavil ich nezvyčajný vzhľad alebo správanie. Červy v kontrolných vzorkách by sa mali zahrabať do sedimentu a mali by sediment požívať. Reprodukcia v kontrolných vzorkách by mala dosahovať prinajmenšom hodnoty podľa kritérií platnosti opísaných v bode 13. Prítomnosť alebo neprítomnosť fekálnych peliet na povrchu sedimentu, ktorá je ukazovateľom požívania sedimentu červami, je potrebné zaznamenať a môže pomôcť pri interpretácii výsledkov testu vo vzťahu k spôsobom expozície. Doplnkové informácie o požívaní sedimentu je možné získať použitím metód opísaných v literatúre (24), (25), (44) a (45), ktoré špecifikujú požívanie sedimentu alebo výber častíc v testovaných organizmoch.

27. Postupy manipulácie s prírodnými sedimentmi ešte pred ich použitím v laboratóriu sú opísané v literatúre (3), (7), (12). Príprava a skladovanie umelého sedimentu, ktorého použitie sa odporúča v prípade testu s červami rodu *Lumbriculus*, sú opísané v dodatku 4.

Aplikácia testovanej chemikálie

28. Testovaná chemikália sa pridá do sedimentu. Keďže v prípade väčšiny testovaných chemikálií sa predpokladá nízka rozpustnosť vo vode, pri príprave zásobného roztoku by sa mali rozpustiť vo vhodnom organickom rozpúšťadle (napr. v acetóne, n-hexáne, cyklohexáne) s čo najmenším objemom. Zo zásobného roztoku by sa mali pripraviť testovacie roztoky zriedením s rovnakým rozpúšťadlom. Toxicita a prchavosť rozpúšťadla, ako aj rozpustnosť testovanej chemikálie vo vybratom rozpúšťadle by mali byť hlavnými kritériami pri výbere vhodného činidla zvyšujúceho rozpustnosť. Pre každú úroveň koncentrácie by sa mal použiť rovnaký objem príslušného roztoku. Sediment by sa mal obohatiť hromadne pre každú úroveň koncentrácie s cieľom minimalizovať variabilitu medzi replikátmi každej úrovne koncentrácie testovanej chemikálie. Každý testovací roztok sa následne zmieša s kremenným pieskom, ako je opísané v bode 22 (napr. 10 g kremenného piesku na jednu testovaciu nádobu). Na to, aby kremenný piesok úplne nasiakol, postačuje objem 0,20 – 0,25 ml roztoku/g piesku. Rozpúšťadlo sa musí následne odpariť do sucha. S cieľom minimalizovať straty testovanej chemikálie pri odparovaní (napr. v závislosti od tlaku pár chemikálie) by sa pokrytý piesok mal použiť ihneď po vysušení. Suchý piesok sa zmieša s vhodným množstvom umelo pripraveného sedimentu zodpovedajúcej úrovne koncentrácie. Množstvo piesku použitého pri príprave zmesi s testovanou chemikáliou sa musí brať do úvahy pri príprave sedimentu (t. j. sediment by sa mal pripraviť s menším množstvom piesku). Hlavnou výhodou tohto postupu je skutočnosť, že do sedimentu sa nedostane prakticky žiadne rozpúšťadlo (7). Alternatívne, napríklad pre pôdny sediment, je možné testovanú chemikáliu pridať obohatením vysušenej a jemne pomletej vzorky sedimentu, ako bolo opísané v prípade kremenného piesku, alebo zamiešaním testovanej chemikálie do mokrého sedimentu a následným odparením všetkého použitého činidla zvyšujúceho rozpustnosť. Je potrebné zabezpečiť, aby sa testovaná chemikália pridávaná do sedimentu dôkladne a rovnomerne distribuovala v sedimente. V prípade potreby je možné analyzovať čiastkové vzorky na potvrdenie cieľovej koncentrácie v sedimente a stanovenie stupňa homogenity. Na potvrdenie cieľovej koncentrácie v sedimente môže byť tiež užitočné analyzovať čiastkové vzorky testovacích roztokov. Keďže na nanášanie testovanej chemikálie na kremenný piesok sa použije rozpúšťadlo, pripraviť by sa mala kontrolná vzorka s rovnakým množstvom rozpúšťadla a testovacích sedimentov. Je potrebné zaznamenať metódu použitú na obohatenie a dôvody na výber konkrétneho postupu obohacovania, ak je iný než uvedené postupy. Metóda obohatenia sa môže prispôsobiť fyzikálno-chemickým vlastnostiam testovanej chemikálie, napríklad aby sa zabránilo stratám spôsobeným odparovaním počas obohacovania alebo vyvažovania. Ďalšie usmernenia o postupoch obohacovania sa uvádzajú v dokumente Environment Canada (1995) (46).

29. Keď je obohatený sediment pripravený, rozmiestnený do paralelných testovacích nádob a prekrytý testovacou vodou, je vhodné umožniť rozdelenie testovanej chemikálie zo sedimentu do vodnej fázy [napr. (3), (7), (9)]. To by sa podľa možnosti malo vykonať za rovnakých teplotných a prevzdušňovacích podmienok, aké sa použijú v teste. Primeraný čas vyvažovania závisí od konkrétneho sedimentu a chemikálie a môže trvať niekoľko hodín až dní a v zriedkavých prípadoch až niekoľko týždňov (štyri až päť týždňov) [napr. (27) (47)]. V rámci tohto testu sa na rovnovážny stav nečaká, ale odporúča sa vyvažovacie obdobie 48 hodín až sedem dní. Preto sa bude minimalizovať čas na degradáciu testovanej chemikálie. V závislosti od účelu štúdie, napríklad keď sa napodobňujú podmienky životného prostredia, obohatený sediment sa môže nechať vyvažovať alebo zrieť aj dlhší čas.

30. Na konci tohto vyvažovacieho obdobia, by sa mali odobrať vzorky na analýzu koncentrácie testovanej chemikálie, prinajmenšom z nadložnej vody a sedimentu, aspoň pri najvyššej koncentrácii a jednej nižšej koncentrácii. Toto analytické skúmanie testovanej látky by malo umožniť výpočet hmotnostnej bilancie a vyjadrenie výsledkov na základe meraných počiatočných koncentrácií. Odoberanie vzoriek vo všeobecnosti narúša alebo ničí systém sedimentu a vody. Preto zvyčajne nie je možné použiť rovnaké replikáty na odber vzoriek sedimentu a červov. Je potrebné pripraviť doplnkové ‚analytické' nádoby vhodných rozmerov, s ktorými sa zaobchádza rovnakým spôsobom (vrátane prítomnosti testovaných organizmov), ale ktoré sa nepoužijú na biologické pozorovania. Rozmery nádob by sa mali zvoliť tak, aby umožňovali vytvorenie vzoriek dostatočne veľkých pre potreby analytickej metódy. Podrobné informácie o odbere vzoriek sú uvedené v bode 53.

VYKONANIE TESTU

Predbežná skúška

31. Ak nie sú dostupné žiadne informácie o toxicite testovanej chemikálie voči druhu *Lumbriculus variegatus*, môže byť užitočné vykonať predbežnú skúšku s cieľom určiť rozsah koncentrácií, ktoré sa majú testovať v rámci konečného testu, a optimalizovať podmienky konečného testu. Na tento účel sa použije súbor koncentrácií testovanej látky s veľkými rozstupmi. Červy sú vystavené každej koncentrácii testovanej chemikálie na určité obdobie (napr. 28 dní ako v rámci konečného testu), ktoré umožňuje odhad vhodných testovacích koncentrácií, pričom sa nevyžadujú žiadne replikáty. Počas predbežného testu je potrebné pozorovať a zaznamenávať správanie červov, napríklad vyhýbanie sa sedimentu, čo môže byť spôsobené testovanou chemikáliou a/alebo sedimentom. Koncentrácie vyššie ako 1 000 mg/kg suchej hmotnosti sedimentu by sa nemali testovať v rámci predbežného testu.

Konečný test

32. V rámci konečného testu by sa malo použiť najmenej päť koncentrácií, ktoré sa zvolia napríklad na základe výsledkov predbežnej skúšky na vyhľadávanie rozsahu (bod 31), ako je uvedené v bodoch 35, 36, 37 a 38.

33. Okrem testovacích sérií sa pripravujú kontrolné vzorky (používanie replikátov je opísané v bodoch 36, 37 a 38), ktoré obsahujú všetky zložky okrem testovanej chemikálie. Ak sa pri aplikácii testovanej chemikálie použije činidlo zvyšujúce rozpustnosť, nemalo by mať žiadny významný vplyv na testované organizmy, čo preukážu doplnkové kontrolné vzorky iba s rozpúšťadlom.

Koncepcia testu

34. Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a rozstupu testovacích koncentrácií, počtu nádob pre každú koncentráciu a počtu červov vložených do každej nádoby. Koncepcie odhadu koncentrácií EC_x, NOEC a vykonania limitného testu sú opísané v bodoch 35, 36, 37 a 38.

35. Účinná koncentrácia (napr. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) a rozsah koncentrácií, v ktorom sa skúmajú účinky testovanej chemikálie, by mali byť v rozsahu koncentrácií použitých v rámci testu. Je potrebné sa vyhnúť extrapolácii hlboko pod najnižšou koncentráciou, ktorá ovplyvňuje testovaný organizmus, alebo nad najvyššou testovacou koncentráciou. Ak sa vo výnimočných prípadoch takáto extrapolácia vykoná, musí sa v správe uviesť úplné vysvetlenie.

36. Ak sa má odhadnúť koncentrácia EC_x, malo by sa testovať najmenej päť koncentrácií a minimálne tri replikáty na každú koncentráciu. Pre kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom, ak sa použijú, sa odporúča šesť replikátov s cieľom zlepšiť odhad variability kontrolných vzoriek. V každom prípade je vhodné použiť dostatočné testovacie koncentrácie, ktoré umožnia dobrý modelový odhad. Faktor rozstupu medzi koncentráciami by nemal byť vyšší ako dva (v prípadoch, keď má krivka závislosti reakcie od koncentrácie plytký sklon, je možné urobiť výnimku). Počet replikátov pri každej aplikácii testovanej chemikálie sa môže znížiť, ak sa zvýši počet testovacích koncentrácií s reakciou v rozsahu 5 – 95 %. Zvýšenie počtu replikátov alebo zúženie intervalov testovacích koncentrácií zvyčajne vedie k užším intervalom spoľahlivosti testu.

37. Ak sa majú odhadnúť hodnoty koncentrácie LOEC/NOEC, malo by sa použiť najmenej päť testovacích koncentrácií s minimálne štyrmi replikátmi (pre kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom, ak sa použijú, sa odporúča šesť replikátov s cieľom zlepšiť odhad variability kontrolných vzoriek) a faktor rozstupu medzi koncentráciami by nemal byť vyšší ako dva. Niektoré informácie o štatistickej významnosti, zistené počas testovania hypotézy v rámci kruhového testu testovacej metódy, sú uvedené v dodatku 6.

38. Môže sa vykonať limitný test (s použitím jednej testovacej koncentrácie a kontrolnej vzorky), ak sa neočakávajú žiadne účinky až do koncentrácie 1 000 mg/kg suchej hmotnosti sedimentu (napr. na základe predbežnej skúšky na vyhľadávanie rozsahu), alebo ak testovanie s jednou koncentráciou bude dostatočné na potvrdenie zisťovanej hodnoty NOEC. V druhom uvedenom prípade by sa do protokolu o skúške malo uviesť podrobné zdôvodnenie výberu hraničnej koncentrácie. Účelom limitného testu je vykonať test pri dostatočne vysokej koncentrácii, ktorá umožní subjektom zodpovedným za rozhodovanie vylúčiť možné toxické účinky testovanej chemikálie a stanoviť hraničnú hodnotu koncentrácie, ktorej výskyt sa neočakáva v žiadnej situácii. Odporúča sa hodnota 1 000 mg/kg (suchej hmotnosti). Zvyčajne je pre vzorky s aplikovanou chemikáliou aj pre kontrolné vzorky potrebných najmenej šesť replikátov. Niektoré informácie o štatistickej významnosti, zistené počas testovania hypotézy v rámci kruhového testu testovacej metódy, sú uvedené v dodatku 6.

Podmienky expozície

Testované organizmy

39. Test sa vykonáva s počtom minimálne desať červov na každý replikát používaný na stanovenie biologických parametrov. Tento počet červov zodpovedá približne 50 – 100 mg čerstvej biomasy. Za predpokladu obsahu sušiny 17,1 % (48) to znamená približne 9 – 17 mg suchej biomasy na jednu nádobu. V norme U.S. EPA (2000) (7) sa odporúča používať veľkosť náplne nepresahujúcu pomer 1: 50 (suchá biomasa: TOC). V prípade umelo pripraveného sedimentu, opísaného v bode 22, to zodpovedá približne 43 g sedimentu (suchá hmotnosť) na 10 červov pri celkovom obsahu TOC 2,0 % suchého sedimentu. V prípadoch, keď sa používa viac ako desať červov na jednu nádobu, by sa malo zodpovedajúcim spôsobom upraviť množstvo sedimentu a nadložnej vody.

40. Červy použité v teste by mali pochádzať z toho istého zdroja a mali by to byť živočíchy v podobnom fyziologickom stave (pozri dodatok 5). Vyberať by sa mali červy podobnej veľkosti (pozri bod 39). Odporúča sa pred testom odvážiť čiastkovú vzorku dávky alebo zásoby červov s cieľom odhadnúť ich strednú hmotnosť.

41. Červy použité v teste sa odoberú z kultúry (podrobnosti sú uvedené v dodatku 5). Veľké (dospelé) živočíchy, ktoré nejavia príznaky nedávnej fragmentácie, sa presunú do sklenených misiek (napr. Petriho misiek) obsahujúcich čistú vodu. Následne sa synchronizujú, ako je opísané v dodatku 5. Po regenerácii v trvaní 10 – 14 dní by sa neporušené úplné červy podobnej veľkosti, ktoré po jemných mechanických podnetoch aktívne plávajú alebo lezú, mali použiť na testovanie. Ak sa podmienky testu líšia od podmienok kultivácie (napr. teplotou, svetelným režimom a nadložnou vodou), fáza aklimatizácie napríklad 24 hodín pri teplote, svetelnom režime a použití rovnakej nadložnej vody ako v rámci testu by mala postačovať, aby sa červy adaptovali na podmienky testu. Adaptované máloštetinavce by sa mali náhodne rozdeliť do testovacích nádob.

Kŕmenie

42. Keďže potrava sa pridáva do sedimentu pred aplikáciou testovanej chemikálie (alebo počas nej), červy sa počas testu ďalej nekŕmia.

Svetlo a teplota

43. Dĺžka fotoperiódy v kultúre a v rámci testu je zvyčajne 16 hodín (3), (7). Intenzita svetla by sa mala udržiavať na nízkej úrovni (napr. 100 – 500 lux), aby sa na povrchu sedimentu napodobňovali prírodné podmienky, a merať by sa mala najmenej raz počas trvania expozície. Teplota by mala byť počas celého testu 20 °C ± 2 °C. Počas jedného daného termínu merania by rozdiel v teplote medzi testovacími nádobami nemal byť vyšší ako ± 1 °C. Testovacie nádoby by mali byť náhodne umiestnené v testovacom inkubátore alebo testovacom priestore, napríklad s cieľom minimalizovať skreslenie reprodukcie v dôsledku umiestnenia nádoby.

Prevzdušňovanie

44. Nadložná voda v testovacích nádobách by sa mala jemne prevzdušňovať (napr. 2 až 4 bubliny za sekundu) prostredníctvom Pasteurovej pipety umiestnenej približne 2 cm nad povrchom sedimentu tak, aby sa minimalizovalo narušenie sedimentu. Treba dbať na to, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesla pod 30 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka. Prívod vzduchu by sa mal kontrolovať a v prípade potreby upraviť najmenej raz denne v pracovné dni.

Meranie kvality vody

45. V nadložnej vode by sa mali merať tieto parametre kvality vody:

Teplota:	najmenej v jednej testovacej nádobe na každú úroveň koncentrácie a v jednej testovacej nádobe s kontrolnou vzorkou, raz týždenne a na začiatku a na konci expozície; ak je to možné, doplnkovo sa môže zaznamenať teplota v okolitom médiu (okolitý vzduch alebo vodný kúpeľ), napríklad v hodinových intervaloch
Obsah rozpusteného kyslíka:	najmenej v jednej testovacej nádobe na každú úroveň koncentrácie a v jednej testovacej nádobe s kontrolnou vzorkou, raz týždenne a na začiatku a na konci expozície; vyjadrený v mg/l a % rozpustnosti vzdušného kyslíka (ASV)
Prívod vzduchu:	mal by sa kontrolovať najmenej raz denne v pracovné dni a v prípade potreby upraviť
pH:	najmenej v jednej testovacej nádobe na každú úroveň koncentrácie a v jednej testovacej nádobe s kontrolnou vzorkou, raz týždenne a na začiatku a na konci expozície
Celková tvrdosť vody:	najmenej v jednom replikáte kontrolnej vzorky a v jednej testovacej nádobe s najvyššou koncentráciou, na začiatku a na konci expozície; vyjadrený v mg/l $CaCO_3$
Celkový obsah amoniaku:	najmenej v jednom replikáte kontrolnej vzorky a v jednej testovacej nádobe na každú úroveň koncentrácie, na začiatku a na konci expozície a následne trikrát týždenne; vyjadrený v mg/l NH_4^+ alebo NH_3 alebo ako celkový amoniak.

Ak si meranie parametrov kvality vody vyžaduje odobratie významných vzoriek vody z nádob, môže byť vhodné vytvoriť samostatné nádoby na meranie kvality vody, aby sa nemenil objemový pomer vody a sedimentu.

Biologické pozorovania

46. Počas expozície by sa mali testovacie nádoby pozorovať s cieľom vizuálne posúdiť akékoľvek rozdiely v správaní červov (napr. vyhýbanie sa sedimentu, fekálne pelety viditeľné na povrch sedimentu) v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Pozorovania je potrebné zaznamenať.

47. Na konci testu sa preskúma každý replikát (doplnkové nádoby určené na chemické analýzy môžu byť z preskúmania vylúčené). Vhodná metóda by sa mala použiť na vybratie všetkých červov z testovacej nádoby. Treba dbať na to, aby sa všetky červy vybrali nezranené. Jednou z možných metód je získanie červov zo sedimentu preosiatím. Použiť sa môže sito z nehrdzavejúcej ocele s vhodnou veľkosťou ôk. Väčšina nadložnej vody sa opatrne vyleje a zvyšný sediment s vodou sa pretrepe, aby vznikol kal, ktorý je možné preosiať cez sito. Ak sa použije sito s otvormi 500 µm, väčšina častíc sedimentu prejde sitom veľmi rýchlo. Celé preosiatie by sa však malo urobiť rýchlo, aby sa zabránilo červom vliezť do ôk sita, alebo cez ne preliezť. Ak sa použije sito s otvormi 250 µm, zabráni to červom vliezť do ôk sita, alebo cez ne preliezť. Je však potrebné dbať na to, aby na site zostalo čo najmenej častíc sedimentu. Preosiaty kal z každej nádoby replikátu sa môže preosiať druhýkrát, aby sa zabezpečilo vybratie všetkých červov. Alternatívnou metódou by mohlo byť zahriatie sedimentu uložením testovacích nádob do vodného kúpeľa s teplotou 50 – 60 °C. Červy opustia sediment a je možné ich vyzbierať z povrchu sedimentu pomocou hladkej pipety so širokým hrotom. Inou alternatívnou metódou by mohlo byť vytvoriť kal zo sedimentu a naliať ho na plytkú misku vhodnej veľkosti. Z plytkej vrstvy kalu sa červy môžu pozbierať pomocou oceľovej ihly alebo hodinárskej pinzety (použije sa skôr ako vidlička než ako kliešte, aby sa zabránilo poraneniu červov) a preniesť do čistej vody. Červy sa po oddelení z kalu sedimentu opláchnu v testovacom médiu a spočítajú.

48. Nezávisle od použitej metódy by laboratóriá mali preukázať, že ich zamestnanci sú schopní získať priemerne najmenej 90 % organizmov z celého sedimentu. Napríklad určitý počet testovaných organizmov by sa mohol vložiť do sedimentu kontrolnej vzorky alebo testovacej vzorky a po 1 hodine by sa mohli vybrať a bolo by možné posúdiť mieru ich opätovného získania (7).

49. Celkový počet žijúcich a mŕtvych jedincov na jeden replikát by sa mal zaznamenať a zhodnotiť. Za mŕtve sa považujú tieto skupiny červov:

a) nereagujú na jemný mechanický podnet;

b) objavujú sa známky rozkladu (v kombinácii s písm. a);

c) počet chýbajúcich červov.

Okrem toho sa živé červy môžu zaradiť do jednej z troch skupín:

a) veľké úplné červy (dospelé) bez regenerovaných častí tela;

b) úplné červy s regenerovanými svetlejšie sfarbenými časťami tela (t. j. novou zadnou časťou, novou prednou časťou alebo s novou prednou aj zadnou časťou);

c) neúplné červy (t. j. nedávno fragmentované červy s neregenerovanými časťami tela).

Tieto doplnkové pozorovania nie sú povinné, ale môžu sa použiť na doplňujúcu interpretáciu biologických výsledkov (napr. vysoký počet červov zaradených do skupiny c môže poukazovať na meškanie reprodukcie alebo regenerácie v danej vzorke s aplikovanou chemikáliou). Okrem toho, ak sa pozorujú rozdiely vo výzore (napr. poškodenia povrchu tela, edémové časti tela) medzi červami zo vzorky s aplikovanou chemikáliou a červami z kontrolnej vzorky, je potrebné ich zaznamenať.

50. Hneď po spočítaní/zhodnotení sa živé červy nájdené v každom replikáte preložia na suché, vopred zvážené a označené misky váh (jedna na každý replikát) a usmrtia sa pomocou kvapky etanolu na každú misku. Misky sa umiestnia do sušiacej piecky a pri teplote 100 °C ± 5 °C sa sušia celú noc, potom sa po ochladení v exsikátore odvážia a stanoví sa suchá hmotnosť červov (podľa možnosti v gramoch, najmenej na 4 desatinné miesta).

51. Okrem celkovej suchej hmotnosti sa môže stanoviť suchá hmotnosť bez popola, podľa opisu v literatúre (49), aby sa zohľadnili anorganické zložky pochádzajúce z požitého sedimentu a prítomné v tráviacom trakte červov

52. Množstvo biomasy sa určí ako celkové množstvo biomasy na jeden replikát vrátane dospelých a juvenilných červov. Pri stanovení množstva biomasy na replikát by sa nemali brať do úvahy mŕtve červy.

Overovanie koncentrácie testovanej chemikálie

Odber vzoriek

53. Vzorky na chemickú analýzu testovanej chemikálie by sa mali odobrať aspoň pri najvyššej koncentrácii a jednej nižšej koncentrácii, prinajmenšom na konci fázy vyvažovania (pred pridaním testovaných organizmov) a na konci testu. Na analýzu by sa mali odobrať prinajmenšom vzorky časti sedimentu a nadložnej vody. V rámci každého termínu odberu vzoriek by sa mali odobrať najmenej dve vzorky na matricu a na vzorku s aplikovanou chemikáliou. Jeden duplikát vzorky sa môže uložiť ako rezerva (ktorá sa bude analyzovať napríklad v prípade, že výsledok počiatočnej analýzy neleží v rozsahu ± 20 % od nominálnej koncentrácie). V prípade osobitných chemických vlastností, napríklad ak sa očakáva rýchla degradácia testovanej chemikálie, sa na základe odborného posúdenia môže spresniť analytický harmonogram (napr. častejšie odbery vzoriek, analýza viacerých úrovní koncentrácie). Vzorky sa môžu odobrať v strednom termíne (napr. v 7. deň po začatí expozície).

54. Vzorka nadložnej vody by sa mala opatrne odobrať odliatím alebo odčerpaním tak, aby sa minimalizovalo narušenie sedimentu. Objem vzorky je potrebné zaznamenať.

55. Po odliatí nadložnej vody by sa mal sediment homogenizovať a preložiť do vhodnej nádoby. Hmotnosť vzorky mokrého sedimentu sa zaznamená.

56. Ak sa dodatočne požaduje analýza testovanej chemikálie v pórovej vode, je potrebné homogenizované a odvážené vzorky sedimentu odstrediť, aby sa získala pórová voda. Napríklad približne 200 ml mokrého sedimentu sa môže uložiť do odstreďovacej kadičky s objemom 250 ml. Potom by sa vzorky mali odstreďovať bez filtrácie, s cieľom izolovať pórovú vodu, napríklad 30 – 60 minút pri odstredivom zrýchlení 10 000 ± 600 × g a pri teplote nepresahujúcej teplotu používanú v rámci testu. Po odstredení sa supernatant opatrne vyleje alebo vyberie pipetou tak, aby v ňom nezostala žiadna častica sedimentu, a objem sa zaznamená. Zaznamená sa aj hmotnosť zostávajúcich peliet sedimentu. Tento údaj môže uľahčiť odhad hmotnostnej bilancie alebo výťažnosti testovanej chemikálie v systéme voda – sediment, ak sa suchá hmotnosť sedimentu určuje v každom termíne odberu vzorky. V niektorých prípadoch nemusí byť možné analyzovať koncentrácie v pórovej vode, lebo vzorka je príliš malá.

57. Ak sa analýza neurobí okamžite, všetky vzorky by sa mali skladovať vhodnou metódou, napríklad podľa podmienok skladovania odporúčaných na dosiahnutie minimálnej degradácie danej testovanej chemikálie (napr. environmentálne vzorky sa bežne skladujú v tme pri teplote – 18 °C). Pred začiatkom štúdie je potrebné získať informácie o vhodných podmienkach skladovania danej testovanej chemikálie – napríklad o trvaní a teplote skladovania, postupoch extrakcie atď.

Analytická metóda

58. Celý postup v zásade závisí od presnosti a citlivosti analytickej metódy použitej v prípade testovanej chemikálie, preto je potrebné experimentálne overiť, či sú presnosť a reprodukovateľnosť chemickej analýzy, ako aj výťažnosť testovanej chemikálie zo vzoriek sedimentu a vody pre danú metódu uspokojivé, aspoň pre najnižšiu a najvyššiu testovanú koncentráciu. Treba tiež overiť, či testovaná chemikália nie je prítomná v kontrolných komorách vo vyšších koncentráciách, ako je kvantifikačný limit. Ak je to potrebné, opraví sa hodnota nominálnej koncentrácie pre výťažnosť obohatených vzoriek na kontrolu kvality (napr. ak je výťažnosť mimo rozsahu 80 – 120 % obohateného množstva). So všetkými vzorkami by sa počas celého testu malo zaobchádzať tak, aby sa minimalizovala kontaminácia a strata (napr. v dôsledku adsorpcie testovanej chemikálie na zariadenie na odber vzoriek).

59. Výťažnosť testovanej chemikálie, kvantifikačný limit a limit detekcie v sedimente a vode by sa mali zaznamenať a uviesť v správe.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

60. Hlavné povinné premenné hodnoty reakcie v rámci testu, ktoré sa majú štatisticky hodnotiť, sú množstvo biomasy a celkový počet červov v jednom replikáte. Voliteľne by sa mohli hodnotiť aj reprodukcia (ako zvýšenie počtu červov) a rast (ako zvýšenie množstva suchej biomasy). V tomto prípade by sa mal získať odhad suchej hmotnosti červov na začiatku expozície, napríklad meraním suchej hmotnosti reprezentatívnej čiastkovej vzorky z dávky synchronizovaných červov, ktoré sa majú použiť v rámci testu.

61. Hoci mortalita nie je parametrom tohto testu, mala by sa hodnotiť v najväčšej možnej miere. Pri odhadovaní mortality by sa za mŕtve mali považovať červy, ktoré nereagujú na jemný mechanický podnet alebo javia príznaky rozkladu, ako aj chýbajúce červy. Mortalita by sa mala zaznamenať a brať do úvahy pri interpretácii výsledkov testu.

62. Účinné koncentrácie by mali byť vyjadrené v mg/kg suchej hmotnosti sedimentu. Ak je výťažnosť testovanej chemikálie nameraná na začiatku expozície v sedimente alebo v sedimente a nadložnej vode 80 – 120 % nominálnej koncentrácie, účinné koncentrácie (EC_x, LOEC, NOEC) sa môžu vyjadriť na základe nominálnej koncentrácie. Ak sa výťažnosť odchyľuje od nominálnej koncentrácie o viac ako ± 20 % nominálnej koncentrácie, účinné koncentrácie (EC_x, LOEC, NOEC) by mali byť založené na koncentráciách pôvodne nameraných na začiatku expozície, napríklad pri zohľadnení hmotnostnej bilancie testovanej chemikálie v testovacom systéme (pozri bod 30). V takýchto prípadoch je možné získať doplnkové informácie z analýzy zásobných roztokov a/alebo aplikačných roztokov s cieľom potvrdiť, že testovacie sedimenty boli pripravené správne.

EC_x

63. Hodnoty EC_x pre parametre uvedené v bode 60 sa vypočítajú pomocou vhodných štatistických metód (napr. probitová analýza, logistická alebo Weibullova funkcia, upravená Spearman-Karberova metóda alebo jednoduchá interpolácia). Usmernenia o štatistickom hodnotení sú uvedené v literatúre (15) a (50). Koncentrácia EC_x sa získa zadaním hodnoty, ktorá zodpovedá x % strednej hodnoty nameranej v kontrolnej vzorke, do príslušnej rovnice. Pri výpočte EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x by sa mali stredné hodnoty pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou ($\overline{X}$) podrobiť regresnej analýze.

NOEC/LOEC

64. Ak je cieľom štatistickej analýzy stanovenie koncentrácie NOEC/LOEC, potrebné sú štatistické údaje pre každú nádobu (jednotlivé nádoby sa považujú za replikáty). Používať by sa mali vhodné štatistické metódy. Vo všeobecnosti sa nepriaznivé účinky testovanej chemikálie v porovnaní s kontrolnými vzorkami skúmajú pomocou jednostranného (obmedzeného) testovania hypotéz pri hodnote $p \leq 0{,}05$. Príklady sú uvedené v ďalších bodoch. Usmernenia k výberu vhodných štatistických metód sú uvedené v literatúre (15) a (50).

65. Normálne rozloženie údajov sa môže testovať napríklad Kolmogorovovým-Smirnovovým testom dobrej zhody, testom pomeru rozsahu k štandardnej odchýlke (R/s test) alebo Shapiro-Wilkovým testom (dvojstranný, $p \leq 0{,}05$). Na testovanie homogenity variancie sa môže použiť Cochranov test, Levenov test alebo Barlettov test (dvojstranný, $p \leq 0{,}05$). Ak sú splnené požiadavky postupov parametrických testov (normalita, homogenita variancie), môže sa vykonať jednostranná analýza variancie (ANOVA) a následné testy viacnásobného porovnania. Párové porovnania (napr. Dunnettov t-test) alebo testy zmiernenia trendu (napr. Williamsov test) sa môžu použiť na výpočet, či existujú výrazné rozdiely ($p \leq 0{,}05$) medzi kontrolnými vzorkami a vzorkami s rôznymi koncentráciami testovanej chemikálie. Inak by sa na stanovenie koncentrácií NOEC a LOEC mali použiť neparametrické metódy (napr. Bonferroniho U-test podľa Holma alebo Jonckheereho-Terpstrov test trendu).

Limitný test

66. Ak sa vykonal limitný test (porovnanie kontrolnej vzorky a len jednej vzorky s aplikovanou chemikáliou) a ak sú splnené požiadavky postupov parametrických testov (normalita, homogenita), metrické reakcie (celkový počet červov a množstvo biomasy ako suchá hmotnosť červov) je možné hodnotiť pomocou Studentovho testu (t-test). Ak tieto požiadavky nie sú splnené, je možné použiť t-test nerovnakej variancie (Welchov t-test) alebo neparametrický test, ako napríklad Mannov-Whitneyho U-test. Niektoré informácie o štatistickej významnosti, zistené počas testovania hypotézy v rámci medzilaboratórnej porovnávacej skúšky testovacej metódy, sú uvedené v dodatku 6.

67. S cieľom určiť významné rozdiely medzi kontrolnými vzorkami (kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom) sa môžu replikáty každej kontrolnej vzorky testovať tak, ako je uvedené pre limitný test. V prípade, že sa týmito testami nezistia významné rozdiely, všetky replikáty kontrolných vzoriek a kontrolných vzoriek s rozpúšťadlom sa môžu spojiť. Inak by sa mali všetky vzorky s aplikovanou chemikáliou porovnať s kontrolnými vzorkami s rozpúšťadlom.

Interpretácia výsledkov

68. Výsledky by sa mali interpretovať opatrne, ak sa vyskytli odchýlky od tejto testovacej metódy, a v prípadoch, keď namerané hodnoty testovacích koncentrácií dosahujú úrovne blízke detekčným limitom použitej analytickej metódy. Všetky odchýlky od tejto testovacej metódy sa musia zaznamenať.

Protokol o skúške

69. Protokol o skúške by mal obsahovať prinajmenšom tieto informácie:

— *Testovaná chemikália:*

— identifikačné údaje chemikálie (bežný názov, chemický názov, štrukturálny vzorec, číslo CAS atď.) vrátane čistoty a analytickej metódy na kvantifikáciu testovanej chemikálie; zdroj testovanej chemikálie, identita a koncentrácia akéhokoľvek použitého rozpúšťadla,

— akékoľvek dostupné informácie o fyzikálnom charaktere a fyzikálno-chemických vlastnostiach, získané pred začiatkom testu (napr. rozpustnosť vo vode, tlak pary, rozdeľovacia konštanta v pôde (alebo v sedimente, ak je k dispozícii), log K_{ow}, stabilita vo vode atď.).

— *Testované druhy:*

— vedecký názov, pôvod, všetky zásahy uskutočnené pred testom, aklimatizácia, kultivačné podmienky atď.

— *Podmienky testu:*

— použitý postup testovania (napr. statický, semistatický alebo prietokový),

— koncepcia testu (napr. počet, materiál a veľkosť testovacích komôr, objem vody na jednu nádobu, hmotnosť a objem sedimentu na jednu nádobu, (pre prietokový alebo semistatický postup: rýchlosť výmeny celého objemu vody), akékoľvek prevzdušňovanie používané pred testom a počas neho, počet replikátov, počet červov v jednom replikáte na začiatku expozície, počet testovacích koncentrácií, dĺžka obdobia kondicionovania, vyvažovania a expozície, frekvencia odberov vzoriek),

— hĺbka sedimentu a nadložnej vody,

— metóda úpravy testovanej chemikálie pred testom a metóda obohatenia/aplikácie testovanej chemikálie,

— nominálne testovacie koncentrácie, podrobnosti týkajúce sa odberu vzoriek na chemickú analýzu a analytické metódy, ktorými sa získali hodnoty koncentrácie testovanej chemikálie,

— vlastnosti sedimentu, ako sú opísané v bodoch 24 a 25, a akékoľvek ďalšie vykonané merania, príprava umelo pripraveného sedimentu,

— príprava vody použitej na testovanie (ak sa použije rekonštituovaná voda) a jej vlastnosti (koncentrácia kyslíka, pH, vodivosť, tvrdosť a výsledky iných vykonaných meraní) pred začatím testu,

— podrobné informácie o kŕmení vrátane druhu potravy, prípravy, množstva a kŕmneho režimu,

— intenzita svetla a dĺžka fotoperiódy, resp. fotoperiód,

— metódy použité na stanovenie všetkých biologických parametrov (napr. odber vzoriek, inšpekcie, váženie testovaných organizmov) a všetky abiotické parametre (napr. parametre kvality vody a sedimentu),

— objem a/alebo hmotnosť všetkých vzoriek na chemickú analýzu

— podrobné informácie o príprave všetkých vzoriek na chemickú analýzu vrátane údajov o príprave, skladovaní, postupoch obohacovania, extrakcii a analytických postupoch (a presnosti) testovanej chemikálie a výťažnosti testovanej chemikálie.

— *Výsledky:*

— kvalita vody v testovacích nádobách (pH, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, tvrdosť, koncentrácia amoniaku a výsledky iných vykonaných meraní),

— celkový obsah organického uhlíka (TOC), pomer suchej hmotnosti k čerstvej hmotnosti, pH sedimentu a výsledky iných vykonaných meraní,

— celkový počet červov a počet úplných a neúplných červov, ak je stanovený, v každej skúšobnej komore na konci testu,

— suchá hmotnosť červov v každej skúšobnej komore na konci testu a suchá hmotnosť čiastkovej vzorky červov na začiatku testu, ak sa meria,

— akékoľvek pozorované nenormálne správanie v porovnaní s kontrolnými vzorkami (napr. vyhýbanie sa sedimentu, prítomnosť alebo neprítomnosť fekálnych peliet),

— celková pozorovaná mortalita,

— odhady toxických konečných parametrov (napr. EC_x, NOEC a/alebo LOEC) a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— nominálne testovacie koncentrácie, namerané testovacie koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách,

— akékoľvek odchýlky od kritéria platnosti.

— *Hodnotenie výsledkov:*

— súlad výsledkov s kritériami platnosti uvedenými v bode 13,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

1. EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.

2. OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

3. ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

4. ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5. Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

6. Chapter C.27 of this Annex, ‚Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment'.

7. U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

8. Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

9. Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

10. BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

11. Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

12. ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

13. Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

14. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

15. Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/___

16. Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

17. Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

18. Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

19. Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

20. Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

21. West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.

22. Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

23. Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

24. Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

25. Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

26. Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

27. Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

28. Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

29. Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

30. Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of^{14} C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

31. Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

32. Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

33. Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

34. Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.

35. Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

36. Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

37. Chapter C.1 of this Annex, Fish, Acute Toxicity Test.

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

39. Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

40. Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

41. Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on ‚Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes', 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

42. Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

43. Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

44. Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

45. Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

46. Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

47. Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588-595.

48. Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

49. Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

50. OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.

51. Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Doplnková literatúra týkajúca sa štatistických postupov:

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

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

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

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

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

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používa toto vymedzenie pojmov:

Chemikália je látka alebo zmes.

Obdobie kondicionovania sa využíva na stabilizovanie mikrobiálnej zložky sedimentu a na odstránenie napríklad amoniaku pochádzajúceho zo zložiek sedimentu; predchádza obohacovaniu sedimentu testovanou chemikáliou. Po kondicionovaní sa nadložná voda zvyčajne odstráni.

EC_x je koncentrácia testovanej chemikálie v sedimente, ktorá v rámci stanoveného času expozície vyvolá účinok x % (napr. 50 %) na biologický parameter.

Obdobie vyvažovania umožňuje rozdelenie testovanej chemikálie medzi tuhú fázu, vodu nachádzajúcu sa v interstíciu sedimentu a nadložnú vodu; prebieha po obohatení sedimentu testovanou chemikáliou a pred pridaním testovaných organizmov.

Fáza expozície je čas, v priebehu ktorého sú testované organizmy vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie.

Umelo pripravený sediment alebo rekonštituovaný, umelý či syntetický sediment je zmes materiálov použitých na napodobnenie fyzických zložiek prírodného sedimentu.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovacia koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa pozoruje, že chemikália má významný toxický účinok (pri $p \leq 0{,}05$) v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Škodlivý účinok všetkých testovacích koncentrácií nad LOEC však musí byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila koncentrácia LOEC (a teda aj koncentrácia NOEC).

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovacia koncentrácia bezprostredne pod koncentráciou LOEC, ktorá v porovnaní s kontrolnou vzorkou nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p \leq 0{,}05$) v rámci daného času expozície.

Rozdeľovacia konštanta oktanol – voda (K_{ow}, niekedy označovaný aj P_{ow}) je pomer rozpustnosti chemikálie v n-oktanole a vo vode v rovnovážnom stave a predstavuje lipofilitu chemikálie (kapitola A.24 tejto prílohy). Parameter K_{ow} alebo logaritmus K_{ow} (log K_{ow}) sa používa na vyjadrenie potenciálu chemikálie na bioakumuláciu vo vodných organizmoch.

Rozdeľovacia konštanta organický uhlík – voda (K_{oc}) je pomer koncentrácie chemikálie vo/na frakcii sedimentu tvorenej organickým uhlíkom a koncentrácie chemikálie vo vode v rovnovážnom stave.

Nadložná voda je voda umiestnená v testovacej nádobe nad sedimentom.

Pórová voda alebo intersticiálna voda je voda nachádzajúca sa v póroch sedimentu alebo pôdy.

Obohatený sediment je sediment, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Dodatok 2

Zloženie odporúčanej rekonštituovanej vody

(prevzaté z kapitoly C.1 tejto prílohy 1)

a) *Roztok chloridu vápenatého*

Rozpustite 11,76 g $CaCl_2 \times 2H_2O$ v deionizovanej vode; doplňte deionizovanou vodou na 1 liter.

b) *Roztok síranu horečnatého*

Rozpustite 4,93 g $MgSO_4 \times 2H_7O$ v deionizovanej vode; doplňte deionizovanou vodou na 1 liter.

c) *Roztok hydrouhličitanu sodného*

Rozpustite 2,59 g $NaHCO_3$ v deionizovanej vode; doplňte deionizovanou vodou na 1 liter.

d) *Roztok chloridu draselného*

Rozpustite 0,23 g KCl v deionizovanej vode; doplňte deionizovanou vodou na 1 liter.

Všetky chemikálie musia byť analytickej čistoty.

Vodivosť destilovanej alebo deionizovanej vody nesmie prekročiť hodnotu 10 μScm^{-1}.

Zmieša sa 25 ml každého z roztokov a) až d) a doplní sa deionizovanou vodou na celkový objem 1 liter. Celkové množstvo iónov vápnika a horčíka v tomto roztoku je 2,5 mmol/l.

Pomer iónov Ca: Mg je 4: 1 a pomer iónov Na: K je 10: 1. Kyselinová kapacita $K_{S4.3}$ tohto roztoku je 0,8 mmol/l.

Rozpúšťacia voda sa prevzdušňuje, pokiaľ sa nedosiahne nasýtenie kyslíkom, potom sa pred použitím uskladní približne na dva dni bez ďalšieho prevzdušňovania.

LITERATÚRA

(1) Chapter C.1 of this Annex, Fish Acute Toxicity Test.

Dodatok 3

Fyzikálno-chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie

Zložka	Koncentrácie
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 µg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zvyškový chlór	< 10 µg/l
Celkové pesticídy na báze organofosfátov	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l
[prevzaté z OECD (1992) (1)]	

LITERATÚRA

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

Dodatok 4

Odporúčaný umelý sediment – usmernenia na prípravu a skladovanie

Zložky sedimentu

Zložka	Charakteristika	% sušiny v sedimente
Rašelina	rašelina s machom z rašelinníka, stupeň rozkladu: ‚stredný', sušená vzduchom, žiadne viditeľné zvyšky rastlín, jemne rozomletá (veľkosť častíc ≤0,5 mm)	5 ± 0,5
Kremenný piesok	veľkosť zrniek: ≤ 2 mm, ale > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 µm);	75 – 76
Kaolínová hlina	obsah kaolinitu ≥ 30 %	20 ± 1
Zdroj potravy	napr. rozomleté listy žihľavy obyčajnej (Folia urticae), listy pŕhľavy dvojdomej (Urtica dioica), jemne rozomleté (veľkosť častíc ≤0,5 mm); v súlade s farmaceutickými normami, na ľudskú spotrebu; navyše k suchému sedimentu	0,4 – 0,5 %
Organický uhlík	upravený pridaním rašeliny a piesku	2 ± 0,5
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý, navyše k suchému sedimentu	0,05 – 1
Deionizovaná voda	vodivosť ≤ 10 µS/cm, navyše k suchému sedimentu	30 – 50

Poznámka: Ak sa predpokladá výskyt zvýšených koncentrácií amoniaku, napríklad ak je testovaná chemikália známym inhibítorom nitrifikácie, môže byť užitočné nahradiť 50 % prášku žihľavy, bohatej na dusík, celulózou [napr. prášková *α*-celulóza, chemicky čistá, veľkosť častíc ≤ 0,5 mm (1) (2)].

Príprava

Rašelina sa usuší vzduchom a rozomelie na jemný prášok. V deionizovanej vode sa pomocou vysokovýkonného homogenizačného prístroja pripraví suspenzia požadovaného množstva rašelinového prášku. Hodnota pH tejto suspenzie sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 5,5 ± 0,5. Suspenzia sa najmenej dva dni nechá kondicionovať s jemným premiešavaním pri teplote 20 ± 2 °C, aby sa stabilizovala hodnota pH a vytvorila stabilná mikrobiálna zložka. Opäť sa zmeria hodnota pH, ktorá by mala byť na úrovni 6,0 ± 0,5. Rašelinová suspenzia sa následne zmieša s ostatnými zložkami (piesok a kaolínová hlina) a s deionizovanou vodou, aby sa získal homogénny sediment s obsahom vody v rozsahu 30 – 50 percent sušiny v sedimente. Znova sa zmeria hodnota pH konečnej zmesi a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,5 – 7,5. Ak sa však očakáva vyvíjanie amoniaku, môže byť užitočné udržiavať hodnotu pH sedimentu pod 7,0 (napr. medzi 6,0 a 6,5). Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa stanovila suchá hmotnosť a obsah organického uhlíka. Ak sa však očakáva vyvíjanie amoniaku, umelo pripravený sediment sa môže kondicionovať sedem dní za rovnakých podmienok, aké budú prevládať v následnom teste (napr. pomer sediment –

voda 1: 4, výška vrstvy sedimentu ako v testovacích nádobách), pred tým, ako bude obohatený testovanou chemikáliou, t. j. mal by sa prekryť vrstvou vody, ktorá sa bude prevzdušňovať. Na konci obdobia kondicionovania by sa mala nadložná voda odobrať a odstrániť. Následne sa obohatený kremenný piesok zmieša so sedimentom pre každú úroveň aplikovanej chemikálie, sediment sa rozdelí do paralelných testovacích nádob a prekryje testovacou vodou. Nádoby sa potom inkubujú za rovnakých podmienok, aké budú prevládať v následnom teste. Tu sa začína obdobie vyvažovania. Nadložná voda by sa mala prevzdušňovať.

Zvolený zdroj potravy by sa mal pridať pred obohacovaním sedimentu testovanou chemikáliou alebo počas neho. Na začiatku sa môže zmiešať s rašelinovou suspenziou (pozri vyššie). Nadmernému rozkladu zdroja potravy ešte pred pridaním testovaných organizmov, napríklad v prípade dlhého obdobia vyvažovania, je možné predísť tým, že obdobie medzi pridaním potravy a začiatkom expozície bude čo najkratšie. S cieľom zabezpečiť, aby bola potrava obohatená testovanou chemikáliou, by sa zdroj potravy mal zmiešať so sedimentom najneskôr v deň, keď sa sediment obohatí testovanou chemikáliou.

Skladovanie

Suché zložky umelého sedimentu sa môžu skladovať na suchom, chladnom mieste alebo pri teplote miestnosti. Umelo pripravený sediment obohatený testovanou chemikáliou by sa mal použiť v rámci testu okamžite. Vzorky obohateného sedimentu sa môžu skladovať v podmienkach odporúčaných pre konkrétnu testovanú chemikáliu až do analýzy.

LITERATÚRA

1. Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

2. Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Dodatok 5

Metódy kultivácie druhu *Lumbriculus variegatus*

Červ druhu *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), čeľade *Lumbriculidae*, triedy *Oligochaeta* je obyvateľom sladkovodných sedimentov a široko sa využíva v ekotoxikologickom testovaní. Ľahko sa kultivuje v laboratórnych podmienkach. V nasledujúcom texte je uvedený prehľad metód kultivácie.

Metódy kultivácie

Kultivačné podmienky pre druh *Lumbriculus variegatus* sú podrobne vysvetlené v prácach Phipps a kol. (1993) (1), Brunson a kol. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Stručné zhrnutie týchto podmienok je uvedené nižšie. Hlavnou výhodou druhu *L. variegatus* je jeho rýchla reprodukcia, čo vedie k rýchlemu nárastu množstva biomasy populácií kultivovaných v laboratóriu [napr. (1), (3), (4), (5)].

Červy je možné kultivovať vo veľkých akváriách (57 – 80 l), pri teplote 23 °C, s fotoperiódou 16 h svetla: 8 h tmy (pri intenzite osvetlenia 100 – 1 000 luxov), s použitím denne obnovovanej prírodnej vody (45 – 50 l na akvárium). Substrát sa pripraví postrihaním nebielených hnedých papierových utierok na pásiky, ktoré sa potom môžu na niekoľko sekúnd zmiešať s kultivačnou vodou, aby vznikol substrát malých kúskov papiera. Tento substrát sa potom môže priamo použiť v akváriu určenom na kultivovanie dážďovičiek *Lumbriculus* tak, že sa ním pokryje dno nádrže, alebo sa uskladní zmrazený v deionizovanej vode na neskoršie použitie. Nový substrát vo všeobecnosti vydrží v nádrži približne dva mesiace.

Každá kultivácia červov sa začína s 500 – 1 000 červami, ktoré sa kŕmia 10 ml suspenzie obsahujúcej 6 g pstruhov ako štartovaciu potravu, trikrát týždenne v podmienkach obnovy alebo prietokového systému. Statické alebo semistatické kultúry by sa mali kŕmiť menšími dávkami, aby sa predišlo rastu baktérií a húb.

Za týchto podmienok sa počet jedincov v rámci kultúry vo všeobecnosti zdvojnásobí počas približne 10 až 14 dní.

Alternatívne sa druh *Lumbriculus variegatus* môže kultivovať aj v systéme pozostávajúcom z vrstvy kremenného piesku, ktorý sa používa ako umelý sediment (hĺbka 1 – 2 cm) a rekonštituovanej vody. Ako kultivačné nádoby sa môžu použiť nádoby zo skla alebo z nerezovej ocele, s výškou 12 – 20 cm. Vrstva vody by sa mala jemne prevzdušňovať (napr. dve bubliny za sekundu) prostredníctvom Pasteurovej pipety umiestnenej približne 2 cm nad povrchom sedimentu. S cieľom zabrániť nahromadeniu napríklad amoniaku by sa nadložná voda mala vymieňať pomocou prietokového systému, alebo aspoň raz za týždeň ručne. Máloštetinavce je možné držať pri teplote miestnosti s fotoperiódou 16 hodín svetla (s intenzitou osvetlenia 100 – 1 000 lx) a 8 hodín tmy. V semistatickej kultúre (obnova vody raz za týždeň) sa červy kŕmia dvakrát týždenne potravou pre ryby TetraMin (napr. 0,6 – 0,8 mg/cm^2 povrchu sedimentu), ktorá sa môže aplikovať ako suspenzia 50 mg TetraMin na každý ml deionizovanej vody.

Červy druhu *Lumbriculus variegatus* sa môžu z kultúr vyberať napríklad prenosom substrátu pomocou jemného sita alebo organizmov pomocou sklenej hladkej pipety so širokým hrotom (s priemerom približne 5 mm), do oddelenej kadičky. Ak sa do tejto kadičky prenáša aj substrát, kadička obsahujúca červov a substrát sa cez noc nechá v prietokových podmienkach, čím sa odstráni z kadičky substrát, zatiaľ čo červy zostanú na dne nádoby. Tie sa potom môžu vložiť do novopripravených kultivačných nádrží, alebo ďalej spracúvať na test, ako je uvedené v literatúre (3) a (4), alebo v ďalšom texte.

Otázka, ktorú treba kriticky zvažovať pri použití druhu *L. variegatus* v rámci testovania v sedimentoch, je jeho spôsob reprodukcie [architómia alebo morfalaxia, napr. (6)]. Toto nepohlavné rozmnožovanie vedie ku vzniku dvoch fragmentov, ktoré počas určitého obdobia neprijímajú potravu, až kým sa hlavová alebo chvostová časť nezregeneruje [napr. (7), (8)]. To znamená, že v prípade druhu *L. variegatus* nedochádza k expozícii prostredníctvom požitia kontaminovaného sedimentu nepretržite.

Preto by sa mala vykonávať synchronizácia s cieľom minimalizovať nekontrolovanú reprodukciu a regeneráciu a následne veľké rozdiely vo výsledkoch testov. Takéto rozdiely môžu vzniknúť, ak viacerí jedinci, ktorí sú fragmentovaní, a preto počas určitého obdobia neprijímajú potravu, sú menej vystavení pôsobeniu testovanej chemikálie ako ostatní jedinci, ktorí počas testu neprejdú fragmentáciou (9), (10), (11). Červy by sa mali umelo fragmentovať 10 – 14 dní pred začiatkom expozície (synchronizácia). Na synchronizáciu by sa mali prednostne vyberať veľké (dospelé) červy, ktoré nevykazujú príznaky nedávnej morfalaxie. Tieto červy sa môžu umiestniť na podložné sklíčko do kvapky kultivačnej vody a skalpelom rozdeliť v strednej časti tela. Treba dbať na to, aby zadné časti mali podobnú veľkosť. Zadné časti by sa potom mali do začiatku expozície nechať v kultivačných nádobách obsahujúcich

rovnaký substrát, aký sa používa v kultúre, a rekonštituovanú vodu, na regeneráciu nových hlavových častí. Príznakom regenerácie nových hlavových častí je, keď sa synchronizované červy zahrabávajú do substrátu (prítomnosť regenerovaných hláv sa môže potvrdiť preskúmaním reprezentatívnej čiastkovej vzorky binokulárnym mikroskopom). Očakáva sa, že testované organizmy budú potom v podobnom fyziologickom stave. To znamená, že keď počas testu dôjde pri synchronizovaných červoch k reprodukcii morfalaxiou, predpokladá sa, že prakticky všetky živočíchy by mali byť rovnako vystavené pôsobeniu obohateného sedimentu. Kŕmenie synchronizovaných červov by sa malo vykonať raz, hneď po tom, ako sa červy začnú zahrabávať do substrátu, alebo sedem dní po rozdelení. Režim kŕmenia by mal byť porovnateľný s riadnymi kultúrami, ale môže byť vhodné kŕmiť synchronizované červy tým istým zdrojom potravy, aký sa bude používať v rámci testu. Červy by sa mali držať pri testovacej teplote 20 °C ± 2 °C. Po regenerácii by sa na test mali použiť neporušené úplné červy podobnej veľkosti, ktoré po jemných mechanických podnetoch aktívne plávajú alebo lezú. Predchádzať by sa malo zraneniam alebo autotómii červov, napríklad používaním pipety s hladkými okrajmi alebo dentálnej pinzety z nehrdzavejúcej ocele na manipuláciu s týmito červami.

Zdroje štartovacích kultúr druhu Lumbriculus variegatus [adresy v USA sú prevzaté z literatúry (4)]

Európa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germany

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germany

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finland

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Germany

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

USA

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research
Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

REFERENCES

1. Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

2. Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

3. ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

4. U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

5. Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

6. Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

7. Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

8. Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

9. Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

10. Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

11. Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

Dodatok 6

Súhrn výsledkov medzilaboratórnej porovnávacej skúšky

‚Test toxicity sedimentu s druhom *Lumbriculus variegatus*'

Tabuľka 1

Výsledky jednotlivých častí medzilaboratórnej porovnávacej skúšky: stredný počet červov v kontrolných vzorkách a v kontrolných vzorkách ošetrených rozpúšťadlom na konci testu. SD = štandardná odchýlka, CV = variačný koeficient

	Stredný počet červov v kontrolných vzorkách	SD	CV (%)	n	Stredný počet červov vo vzorkách ošetrených rozpúšťadlom	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
Medzilaboratórna stredná hodnota	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
min.	**16,3**				**15,0**			
max.	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

Tabuľka 2

Výsledky jednotlivých častí medzilaboratórnej porovnávacej skúšky: stredná celková suchá hmotnosť červov na jeden replikát v kontrolných vzorkách a v kontrolných vzorkách ošterených rozpúšťadlom na konci testu. SD = štandardná odchýlka, CV = variačný koeficient

	Celková suchá hmotnosť červov na replikát (kontrolné vzorky)	SD	CV (%)	n	Celková suchá hmotnosť červov na replikát (kontrolné vzorky ošetrené rozpúšťadlom)	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
Medzilaboratórna stredná hodnota	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
min.	**12,9**				**10,5**			
max.	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

Tabuľka 3

Toxicita PCP: súhrn konečných parametrov v medzilaboratórnej porovnávacej skúške; medzilaboratórne stredné hodnoty EC_{50}, NOEC a LOEC. SD = štandardná odchýlka, CV = variačný koeficient

Biologický parameter		Medzilaboratórna stredná hodnota	min.	max.	Medzilaboratórny faktor	SD	CV (%)	geometrický priemer (mg/kg)
celkový počet červov	**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				
Celková suchá hmotnosť červov	**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				
Mortalita/prežitie	**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
Reprodukcia (zvýšenie počtu červov na replikát)	**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				
Rast (zvýšenie množstva biomasy na replikát)	**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: minimálny zistiteľný rozdiel oproti hodnotám kontrolných vzoriek pri testovaní hypotézy; používa sa na meranie štatistickej významnosti.

LITERATÚRA

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

C.36 REPRODUKČNÝ TEST S DRAVÝMI ROZTOČMI [*HYPOASPIS ACULEIFER* (*GEOLAELAPS*)] V PÔDE

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 226 (2008). Táto testovacia metóda je určená na odhadnutie účinkov chemikálií v pôde na reprodukčný výstup pôdnych dravých roztočov *Hypoaspis aculeifer (Geolaelaps)* Canestrini (*Acari*: čeľaď *Laelapidae*), a teda umožňuje odhad inhibície špecifickej rýchlosti rastu populácie (1), (2). Reprodukčný výstup tu znamená počet juvenilných jedincov na konci testovacieho obdobia. Roztoče druhu *H. aculeifer* predstavujú doplnok tropickej úrovne k druhom, pre ktoré sú testovacie metódy už k dispozícii. Reprodukčný test bez diskriminácie a kvantifikácie rôznych fáz reprodukčného cyklu sa považuje za primeraný na účely tejto testovacej metódy. Pre chemické látky s iným expozičným scenárom, ako je expozícia prostredníctvom pôdy, by mohli byť vhodné iné prístupy (3).

2. Druh *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* sa považuje za relevantného predstaviteľa pôdnej fauny a najmä dravých roztočov. Je zastúpený na celom svete (5) a je možné ho ľahko zhromažďovať a chovať v laboratóriu. Súhrn venovaný biológii druhu *H. aculeifer* je uvedený v dodatku 7. Základné informácie o ekológii jednotlivých druhov roztočov a ich použití v ekotoxikologickom testovaní sú k dispozícii v literatúre (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINCÍP SKÚŠKY

3. Dospelé samičky sú vystavené účinkom rôznych koncentrácií testovanej chemikálie zamiešanej do pôdy. Test sa začína s desiatimi dospelými samičkami na jednu paralelnú nádobu. Samčekovia nie sú v teste zahrnutí, lebo zo skúseností vyplynulo, že ak sú samčekovia prítomní, samičky sa pária ihneď alebo krátko po ukončení štádia deutonymfy. Okrem toho, začlenenie samčekov by predĺžilo test natoľko, že by bola potrebná namáhavá diskriminácia podľa štádií veku. Samotné párenie teda nie je súčasťou testu. Samičky sa synchronizovane zapoja do testu 28 – 35 dní po začiatku obdobia kladenia vajíčok (pozri dodatok 4), lebo vtedy je možné predpokladať, že samičky sú už spárené a že prešli štádiom predchádzajúcim kladeniu vajíčok. Pri teplote 20 °C sa test skončí v 14. deň po zapojení samičiek (0. deň), čo umožňuje prvej kontrolnej skupine potomkov dosiahnuť štádium deutonymfy (pozri dodatok 4). Ako hlavná meraná premenná hodnota sa stanoví počet juvenilných jedincov na jednu testovaciu nádobu a okrem toho počet samičiek, ktoré prežili. Reprodukčný výstup roztočov vystavených pôsobeniu testovanej chemikálie sa porovnáva s výsledkami kontrolných vzoriek s cieľom stanoviť hodnotu EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) alebo koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC) (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1), v závislosti od použitej koncepcie experimentu (pozri bod 29). Prehľad harmonogramu testu je uvedený v doplnku 8.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

4. Predovšetkým by mala byť známa rozpustnosť vo vode, hodnota log K_{ow}, rozdeľovacia konštanta pôdnej vody a tlak pary testovanej chemikálie. Žiaduce sú tiež doplnkové informácie o osude testovanej chemikálie v pôde, napríklad rýchlosť biotickej a abiotickej degradácie.

5. Táto testovacia metóda sa môže použiť na chemikálie rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Spôsob aplikácie testovanej chemikálie sa však bude zodpovedajúcim spôsobom líšiť. Testovacia metóda nie je použiteľná v prípade prchavých chemikálií, t. j. chemikálií, pre ktoré je hodnota Henryho konštanty alebo rozdeľovacej konštanty vzduch/voda vyššia ako jeden, alebo chemikálií, pre ktoré tlak pár pri teplote 25 °C presahuje hodnotu 0,0133 Pa.

PLATNOSŤ TESTU

6. Na to, aby sa výsledok testu považoval za platný, by v kontrolných vzorkách bez aplikovanej chemikálie mali byť splnené tieto kritériá:

   — stredná mortalita dospelých samičiek by nemala presiahnuť 20 % na konci testu,

   — stredný počet juvenilných jedincov v každom replikáte (desať dospelých samičiek) by mala byť najmenej 50 na konci testu,

   — variačný koeficient vypočítaný pre počet mladých roztočov v replikáte by nemal byť vyšší ako 30 % na konci konečného testu.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

7. Musia sa stanoviť hodnoty koncentrácií EC_x a/alebo NOEC referenčnej chemikálie, aby sa zabezpečilo, že laboratórne podmienky testu sú primerané, a aby sa overilo, že reakcia testovaných organizmov sa postupom času výrazne nezmenila. Vhodnou referenčnou chemikáliou je dimetoát (CAS 60-51-5), pri ktorom sa preukázalo, že ovplyvňuje veľkosť populácie (4). Ako alternatívna referenčná chemikália sa môže použiť kyselina boritá (CAS 10043-35-3). S touto chemikáliou sa zatiaľ získalo menej skúseností. Možné sú dve alternatívne koncepcie:

— Referenčná chemikália sa môže testovať súbežne so stanovením toxicity každej testovanej chemikálie s jednou koncentráciou, ktorá sa musí vopred preukázať v štúdii odozvy na dávku s výsledkom zníženia počtu potomstva o > 50 %. V tomto prípade by mal byť počet replikátov rovnaký ako pri kontrolných vzorkách (pozri bod 29).

— Alternatívne sa referenčná chemikália testuje jeden až dvakrát ročne v rámci testu odozvy na dávku. V závislosti od zvolenej koncepcie sa líši počet koncentrácií a replikátov, ako aj faktor rozstupu (pozri bod 29), ale dosiahnuť by sa mala reakcia zodpovedajúca účinku 10 – 90 % (faktor rozstupu 1,8). Hodnota EC_{50} pre dimetoát, na základe počtu juvenilných jedincov, by mala byť v rozsahu 3,0 – 7,0 mg účinnej látky/kg pôdy (suchá hmotnosť). Podľa výsledkov získaných doteraz s kyselinou boritou by hodnota EC50 na základe počtu juvenilných jedincov mala byť v rozsahu 100 – 500 mg/kg /kg suchej hmotnosti pôdy.

OPIS TESTU

Testovacie nádoby a vybavenie

8. Používať by sa mali testovacie nádoby s priemerom 3 – 5 cm (výška pôdy ≥ 1,5 cm), vyrobené zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu a s priliehavým vekom. Uprednostňujú sa skrutkovacie uzávery a v tom prípade by sa nádoby mohli prevzdušňovať dvakrát týždenne. Alternatívne sa môžu používať uzávery, ktoré umožňujú priamu výmenu plynov medzi substrátom a atmosférou (napr. gáza). Keďže obsah vlhkosti musí byť počas testu dostatočne vysoký, je dôležité počas testu kontrolovať hmotnosť každej testovacej nádoby a v prípade potreby doplniť vodu. Toto môže byť mimoriadne dôležité, ak nie sú k dispozícii žiadne skrutkovacie uzávery. Ak sa používa nepriesvitná testovacia nádoba, uzáver by mal byť vyrobený z materiálu, ktorý umožňuje prístup svetla (napr. perforovaný priesvitný uzáver), ale zároveň zabraňuje roztočom v úniku. Veľkosť a druh testovacej nádoby závisí od metódy extrakcie (podrobnosti sú uvedené v dodatku 5). Ak sa tepelná extrakcia deje priamo v testovacej nádobe, mohlo by sa pridať spodné sito s vhodnou veľkosťou ôk (utesnené až do extrakcie) a hĺbka pôdy by mala byť dostatočná na to, aby sa dosiahol gradient teploty a vlhkosti.

9. Potrebné je bežné laboratórne vybavenie, konkrétne:

— prednostne sklené nádoby so skrutkovacími uzávermi,

— skrinka na sušenie,

— stereomikroskop,

— kefy na prenos roztočov,

— pH-meter a luxmeter,

— vhodné presné váhy,

— vhodné zariadenie na regulovanie teploty,

— vhodné zariadenia na regulovanie vlhkosti vzduchu (nie je to nevyhnutné, ak nádoby s exponovanými vzorkami majú veká),

— inkubátor alebo malá miestnosť s reguláciou teploty,

— zariadenie na extrakciu (pozri dodatok 5) (13),

— vrchný osvetľovací panel s reguláciou osvetlenia,

— nádoby na zbieranie vybratých roztočov.

Príprava umelej pôdy

10. Pri tomto teste sa použije umelo pripravená pôda. Umelo pripravená pôda sa skladá z týchto zložiek (všetky hodnoty sú založené na suchej hmotnosti):

— 5 % rašeliny, vysušenej vzduchom a jemne drvenej (prijateľné sú častice veľkosti 2 mm ± 1 mm);

— 20 % kaolínovej hliny (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %),

— približne 74 % vzduchom vysušeného kremenného piesku (v závislosti od potrebného množstva $CaCO_3$), prevažne jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 mikrónov. Presné množstvo piesku závisí od množstva $CaCO_3$ (pozri nižšie), pričom spoločne by mali predstavovať až 75 %,

— < 1 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, práškový, analytickej čistoty) na dosiahnutie hodnoty pH 6,0 ± 0,5; pridávané množstvo uhličitanu vápenatého môže do značnej miery závisieť od kvality/vlastností rašeliny (pozri poznámku 1).

Poznámka 1: potrebné množstvo $CaCO_3$ bude závisieť od zložiek pôdneho substrátu a malo by sa stanoviť na základe merania hodnoty pH čiastkových vzoriek pôdy bezprostredne pred testom (14).

Poznámka 2: obsah rašeliny v umelej pôde sa líši od iných testovacích metód s pôdnymi organizmami, kde sa vo väčšine prípadov používa 10 % rašeliny [napr. (15)]. Podľa organizácie EPPO (16) však typická poľnohospodárska pôda neobsahuje viac ako 5 % organickej hmoty, a tak zníženie obsahu rašeliny odráža zníženú možnosť sorpcie testovanej chemikálie na organický uhlík v prírodnej pôde.

Poznámka 3: ak je to potrebné, napríklad na konkrétne účely testovania, prírodná pôda z neznečistených miest môže slúžiť aj ako testovací a/alebo kultivačný substrát. Ak sa však použije prírodná pôda, mali by sa uviesť prinajmenšom údaje o pôvode (mieste odberu), pH, textúre (rozdelení veľkosti častíc) a obsahu organických látok. Zahrnutý by mal byť aj druh a názov pôdy podľa klasifikácie pôdy, ak je k dispozícii, a pôda by nemala byť ničím kontaminovaná. V prípade, že testovanou chemikáliou je kov alebo organokovová zlúčenina, mala by sa určiť aj kapacita katiónovej výmeny prírodnej pôdy. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať plneniu kritérií platnosti, keďže základné informácie o prírodných pôdach sú spravidla zriedkavé.

11. Suché zložky pôdy sa dôkladne zmiešajú (napr. vo veľkokapacitnom laboratórnom miešači). Na stanovenie pH sa používa zmes pôdy a roztoku 1 M chloridu draselného (KCl) alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) v pomere 1: 5 (pozri literatúru (14) a dodatok 3). Ak je pôda kyslejšia než požadovaný rozsah (pozri bod 10), môže sa upraviť pridaním príslušného množstva $CaCO_3$. Ak je pôda príliš alkalická, môže sa upraviť pridaním väčšieho množstva zmesi obsahujúcej prvé tri zložky uvedené v bode 10, no bez $CaCO_3$.

12. Maximálna kapacita zadržiavania vody umelej pôdy sa stanoví v súlade s postupmi opísanými v dodatku 2. Dva až sedem dní pred začiatkom testu sa suchá umelá pôda predvlhčí pridaním dostatočného množstva destilovanej alebo deionizovanej vody, aby sa dosiahla približne polovica konečného obsahu vody, čo je 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody. Obsah vlhkosti sa upraví na 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody pridaním roztoku testovanej chemikálie a/alebo pridaním destilovanej alebo deionizovanej vody (pozri body 16 až 18). Hrubú kontrolu obsahu vlhkosti v pôde je možné vykonať jemným stláčaním pôdy v ruke. Ak je obsah vlhkosti správny, medzi prstami by sa mali objaviť malé kvapky vody.

13. Obsah vlhkosti v pôde sa stanoví na začiatku a na konci testu vysušením na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C v súlade s normou ISO 11465 (17) a hodnota pH pôdy sa stanoví v súlade s dodatkom 3 alebo normou ISO 10390 (14). Tieto merania by sa mali vykonať v doplnkových vzorkách bez roztočov, z kontrolnej vzorky pôdy aj zo vzorky pôdy s každou testovacou koncentráciou. Hodnota pH pôdy by sa pri testovaní kyslých alebo zásaditých chemikálií nemala upravovať. Obsah vlhkosti by sa mal monitorovať počas celého testu pravidelným vážením nádob (pozri body 20 a 24).

Výber a príprava testovaných živočíchov

14. V rámci testu sa používa druh *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Na začiatku testu sú potrebné dospelé samičky roztočov, získané zo synchronizovanej populácie. Roztoče by sa mali vložiť do nádob približne 7 – 14 dní pred dosiahnutím dospelosti, 28 – 35 dní po začiatku kladenia vajíčok v rámci synchronizácie (pozri bod 3 a dodatok 4). Zdroj roztočov alebo dodávateľ a udržiavateľ laboratórnej kultúry by sa mali zaznamenať. Ak sa laboratórna kultúra uchováva, odporúča sa potvrdiť identitu daného druhu najmenej raz do roka. Identifikačný list je uvedený v dodatku 6.

Príprava testovaných koncentrácií

15. Testovaná chemikália sa zamieša do pôdy. Organické rozpúšťadlá používané na pomoc pri aplikovaní testovanej chemikálie do pôdy by sa mali vyberať na základe ich nízkej toxicity pre roztoče a do koncepcie testu musí byť zahrnutá primeraná kontrola rozpúšťadla (pozri bod 29).

Testovaná chemikália rozpustná vo vode

16. Roztok testovanej chemikálie sa pripravuje s deionizovanou vodou v množstve dostatočnom pre všetky replikáty jednej testovacej koncentrácie. Odporúča sa použitie primeraného množstva vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti, t. j. 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody (pozri bod 12). Každý roztok testovanej chemikálie sa pred vložením do testovacej nádoby dôkladne premieša s jednou šaržou predvlhčenej pôdy.

Testovaná chemikália nerozpustná vo vode

17. V prípade chemikálií nerozpustných vo vode, ale rozpustných v organických rozpúšťadlách, sa testovaná chemikália môže rozpustiť v čo najmenšom objeme vhodného nosiča (napr. acetónu). Používať by sa mali iba prchavé rozpúšťadlá. Keď sa použijú takéto nosiče, všetky testovacie koncentrácie a kontrolné vzorky by mali obsahovať rovnaké minimálne množstvo nosiča. Nosič sa nastrieka na malé množstvo, napríklad 10 g, jemného kremenného piesku, alebo sa s ním zmieša. Celkový obsah piesku v substráte by sa mal upraviť na toto množstvo. Nosič sa odstráni najmenej hodinovým odparovaním pod digestorom. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do predvlhčenej pôdy a po pridaní primeraného množstva deionizovanej vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti, sa dôkladne premieša. Konečná zmes sa vloží do testovacích nádob. Treba si uvedomiť, že niektoré rozpúšťadlá môžu byť pre roztoče toxické. Preto sa odporúča použiť doplnkové kontrolné vzorky vody bez nosiča, ak toxicita rozpúšťadla pre roztoče nie je známa. Ak sa náležite preukáže, že rozpúšťadlo (v koncentráciách, ktoré sa majú použiť) nemá žiadne účinky, kontrolné vzorky vody sa môžu vylúčiť.

Testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode a v organických rozpúšťadlách

18. V prípade chemikálií, ktoré sú slabo rozpustné vo vode a v organických rozpúšťadlách, sa ekvivalent 2,5 g jemne drveného kremenného piesku na jednu testovaciu nádobu (napr. 10 g jemného kremenného piesku na štyri replikáty) zmieša s príslušným množstvom testovanej chemikálie na dosiahnutie požadovanej testovacej koncentrácie. Celkový obsah piesku v substráte by sa mal upraviť na toto množstvo. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do predvlhčenej pôdy a po pridaní primeraného množstva deionizovanej vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti, sa dôkladne premieša. Konečná zmes sa rozdelí do testovacích nádob. Tento postup sa opakuje pre každú testovaciu koncentráciu a pripraví sa vhodná kontrolná vzorka.

POSTUP

Testované skupiny a kontrolné vzorky

19. Odporúča sa vložiť do každej nádoby s kontrolnou vzorkou a nádoby s aplikovanou chemikáliou desať dospelých samičiek v 20 g suchej hmotnosti umelej pôdy. Testované organizmy by sa mali pridať do dvoch hodín po príprave konečného testovacieho substrátu (t. j. po aplikácii testovanej chemikálie). V osobitných prípadoch (napr. ak sa starnutie považuje za rozhodujúci faktor) je možné predĺžiť čas medzi prípravou záverečného testovacieho substrátu a vložením roztočov [podrobnosti týkajúce sa takého starnutia sú uvedené v literatúre pod číslom (18)]. V takýchto prípadoch sa však musí poskytnúť vedecké zdôvodnenie.

20. Po vložení do pôdy sa roztočom poskytne potrava a mala by sa odmerať počiatočná hmotnosť každej testovacej nádoby. Tento údaj sa použije ako referenčná hodnota pre monitorovanie obsahu vlhkosti v pôde počas testu, ako je uvedené v bode 24. Testovacie nádoby sa potom uzavrú, ako je opísané v bode 8, a uložia do testovacej komory.

21. Pre každú z metód aplikácie testovanej chemikálie opísaných v bodoch 15 – 18 sa pripraví vhodná kontrolná vzorka. Pri príprave kontrolných vzoriek sa dodržiavajú príslušné uvedené postupy, s výnimkou toho, že sa nepridá testovaná chemikália. Preto, ak je to vhodné, do kontrolných vzoriek sa pridávajú organické rozpúšťadlá, kremenný piesok alebo iné nosiče v rovnakých koncentráciách/množstvách ako do vzoriek s aplikovanou chemikáliou. Ak sa na pridávanie testovanej chemikálie používa rozpúšťadlo alebo iný nosič, mali by sa pripraviť a otestovať aj doplnkové kontrolné vzorky bez nosiča alebo testovanej chemikálie, ak toxicita rozpúšťadla nie je známa (pozri bod 17).

Podmienky testu

22. Testovacia teplota by mala byť 20 °C ± 2 °C. Teplota by sa mala zaznamenať minimálne jedenkrát za deň a v prípade potreby upraviť. Test sa vykonáva v kontrolovaných cykloch svetla a tmy (podľa možnosti 16 hodín svetla a 8 hodín tmy) s intenzitou osvetlenia 400 – 800 luxov v okolí testovacích nádob. Z dôvodu porovnateľnosti sú tieto podmienky rovnaké ako pri iných pôdnych ekotoxikologických testoch [napr. (15)].

23. V prípade použitia skrutkovacích uzáverov by sa mala zabezpečiť výmena plynov prevzdušňovaním testovacích nádob najmenej dvakrát týždenne. Ak sa použijú gázové veká, osobitnú pozornosť treba venovať udržiavaniu obsahu vlhkosti v pôde (pozri body 8 a 24).

24. Obsah vody v pôdnom substráte v testovacích nádobách sa počas celého testu udržiava pravidelným vážením testovacích nádob a v prípade potreby dopĺňaním vody (napr. raz týždenne). Straty sa podľa potreby dopĺňajú deionizovanou vodou. Obsah vlhkosti by sa počas testu nemal líšiť od počiatočnej hodnoty o viac ako 10 %.

Kŕmenie

25. Ako vhodný zdroj potravy sa ukázali syrové roztoče [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)]. Vhodné môžu byť aj malé chvostoskoky (napr. mladé jedince druhu *Folsomia candida* Willem, 1902 alebo *Onychiurus fimatus*) (19), (20), červy čeľade *Enchytraeidae* (napr. *Enchytraeus crypticus* Westheide a Graefe, 1992) alebo hlístovce (napr. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913) (21). Odporúča sa kontrolovať potravu pred použitím v rámci testu. Druhom a množstvom potravy by sa mal zabezpečiť dostatočný počet juvenilných jedincov v záujme splnenia kritérií platnosti (bod 6). Pri výbere koristi by sa mal zvážiť spôsob pôsobenia testovanej chemikálie (napr. akaricídny prostriedok môže byť toxický aj pre potravinové roztoče, pozri bod 26).

26. Potrava by sa mala poskytovať *ad libitum* [t. j. zakaždým v malom množstve (na špičku lopatky)]. Na tento účel sa môže tiež použiť odsávač s miernym saním, ako sa navrhuje v teste s chvostoskokmi, alebo jemný štetec. Dodanie potravy na začiatku testu a potom dva- až trikrát týždenne obvykle postačuje. Ak sa testovaná chemikália zdá byť toxická pre korisť, je potrebné zvážiť zintenzívnenie kŕmenia a/alebo alternatívny zdroj potravy.

Výber testovaných koncentrácií

27. Predchádzajúce poznatky o toxicite testovanej chemikálie by mali pomôcť pri výbere vhodných testovaných koncentrácií, napríklad zo štúdií týkajúcich sa vyhľadávania rozsahu. V prípade potreby sa vykoná test na vyhľadávanie rozsahu s piatimi koncentráciami testovanej chemikálie v rozsahu 0,1 – 1 000 mg/kg suchej pôdy, najmenej s jedným replikátom pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú vzorku. Test na vyhľadávanie rozsahu trvá 14 dní a na konci testu sa posudzuje mortalita dospelých roztočov a počet juvenilných jedincov. Rozsah koncentrácií v konečnom teste by sa mal podľa možnosti zvoliť tak, aby zahŕňal koncentrácie, ktoré ovplyvňujú počty juvenilných jedincov, ale neovplyvňujú prežívanie materskej generácie. To však nemusí byť možné pre chemikálie, ktoré spôsobujú letálne a subletálne účinky pri takmer rovnakých koncentráciách. Účinná koncentrácia (napr. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) a rozsah koncentrácií, v ktorom sa skúmajú účinky testovanej chemikálie, by mali byť v rozsahu koncentrácií použitých v rámci testu. Iba vo výnimočných prípadoch by sa mala robiť extrapolácia hlboko pod najnižšou koncentráciou, ktorá ovplyvňuje testovaný organizmus, alebo nad najvyššou testovacou koncentráciou. V takých prípadoch by sa malo v protokole uviesť úplné vysvetlenie.

Koncepcia experimentu

Testy závislosti reakcie od dávky

28. Na základe odporúčaní vyplývajúcich z ďalšej medzilaboratórnej porovnávacej skúšky sa navrhujú tri koncepcie testu [skúška reprodukcie bielych červov (*Enchytraeid*) (22)]. Všeobecnú vhodnosť všetkých týchto koncepcií potvrdil výsledok validácie druhu *H. aculeifer*.

29. Pri stanovení rozsahu koncentrácií treba mať na zreteli tieto skutočnosti:

— na stanovenie hodnoty EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) by sa malo testovať dvanásť koncentrácií. Odporúčajú sa najmenej dva replikáty pre každú testovanú koncentráciu a šesť kontrolných replikátov. Faktor rozstupu sa môže meniť, t. j. môže mať hodnotu najviac 1,8 v očakávanom rozsahu účinkov a viac ako 1,8 pri vyšších a nižších koncentráciách.

— Na stanovenie hodnoty NOEC by sa malo testovať aspoň päť koncentrácií v geometrickej sérii. Odporúčajú sa štyri replikáty na každú testovanú koncentráciu a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 2,0.

— Kombinovaný prístup umožňuje určenie obidvoch koncentrácií, NOEC aj EC_x. Použiť by sa malo osem koncentrácií aplikovanej chemikálie v geometrickom rade. Odporúčajú sa štyri replikáty pre každú aplikáciu chemikálie a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 1,8.

Limitný test

30. Ak sa v rámci testu na vyhľadávanie rozsahu nepozorujú žiadne účinky ani pri najvyššej koncentrácii (t. j. 1 000 mg/kg suchej hmotnosti pôdy), konečný reprodukčný test sa môže vykonať ako limitný test s použitím testovacej koncentrácie 1 000 mg/kg suchej hmotnosti pôdy. Limitný test umožní dokázať, že hodnota NOEC alebo EC_{10} z hľadiska reprodukcie je vyššia ako limitná koncentrácia, a zároveň sa minimalizuje počet roztočov použitých v rámci testu. Pre vzorky pôdy s aplikovanou chemikáliou aj pre kontrolné vzorky by sa malo použiť osem replikátov.

Trvanie testu a merania

31. Mali by sa zaznamenať všetky zistené rozdiely medzi správaním a morfológiou roztočov v kontrolných nádobách a v nádobách s aplikovanou chemikáliou.

32. Na 14. deň sa roztoče, ktoré prežili, vyberú z pôdy extrakciou pomocou tepla/svetla alebo inou vhodnou metódou (pozri dodatok 5). Osobitne sa spočítajú juvenilné jedince (t. j. larvy, protonymfy a deutonymfy) a dospelé jedince. Všetky dospelé roztoče, ktoré sa v tomto čase nenájdu, sa zaznamenajú ako mŕtve, lebo je možné predpokladať, že takéto roztoče pred hodnotením uhynuli a rozložili sa. Účinnosť extrakcie sa musí overovať raz alebo dvakrát ročne v kontrolných vzorkách so známym počtom dospelých a juvenilných jedincov. Účinnosť by mala v priemere presahovať hodnotu 90 %, kombinovane pre všetky vývojové štádiá (pozri dodatok 5). Počty dospelých a juvenilných jedincov sa neupravujú z hľadiska účinnosti.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

33. Informácie o štatistických metódach, ktoré sa môžu použiť na analýzu výsledkov testu, sú uvedené v bodoch 36 až 41. Okrem toho je potrebné používať dokument OECD 54 ‚Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návod na uplatňovanie' (31).

34. Hlavným parametrom testu je reprodukčný výstup, v tomto prípade počet juvenilných jedincov vyprodukovaných na jednu paralelnú testovaciu nádobu (s desiatimi vloženými dospelými samičkami). Štatistická analýza si vyžaduje aritmetický priemer (x) a rozptyl (s^2) reprodukčného výstupu, ktorý sa vypočíta na jednu vzorku s aplikovanou chemikáliou a na jednu kontrolnú vzorku. Hodnoty x a s^2 sa používajú v rámci postupov ANOVA, ako je napríklad Studentov t-test, Dunnettov test alebo Williamsov test, ako aj na výpočet 95 % intervalov spoľahlivosti.

Poznámka: Tento hlavný parameter je rovnocenný s parametrom plodnosti, ktorá sa určuje ako podiel počtu žijúcich juvenilných jedincov vyprodukovaných počas testu a počtu rodičovských samičiek použitých na začiatku testu.

35. Počet samičiek, ktoré prežili v kontrolných vzorkách bez aplikovanej chemikálie, je hlavným kritériom platnosti a musí sa zdokumentovať. Podobne ako v rámci testu na vyhľadávanie rozsahu by sa aj všetky škodlivé príznaky mali uviesť v záverečnej správe.

ECx

36. Hodnoty ECx vrátane ich príslušných spodných a vrchných 95 % hraníc spoľahlivosti pre parameter uvedený v bode 34 sa vypočítajú pomocou vhodných štatistických metód (napr. probitová analýza, logistická alebo Weibullova funkcia, upravená Spearman-Karberova metóda alebo jednoduchá interpolácia). Koncentrácia EC_x sa získa zadaním hodnoty, ktorá zodpovedá x % strednej hodnoty nameranej v kontrolnej vzorke, do príslušnej rovnice. Pri výpočte EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x by sa mali stredné hodnoty pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou (x) podrobiť regresnej analýze.

NOEC/LOEC

37. Ak je cieľom štatistickej analýzy stanovenie koncentrácie NOEC/LOEC, potrebné sú štatistické údaje pre každú nádobu (jednotlivé nádoby sa považujú za replikáty). Používať by sa mali vhodné štatistické metódy (podľa dokumentu OECD 54 ‚Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návod na uplatňovanie'). Vo všeobecnosti sa nepriaznivé účinky testovanej chemikálie v porovnaní s kontrolnými vzorkami skúmajú pomocou jednostranného (obmedzeného) testovania hypotéz pri hodnote $p \leq 0{,}05$. Príklady sú uvedené v ďalších bodoch.

38. Normálne rozloženie údajov sa môže testovať napríklad Kolmogorovovým-Smirnovovým testom dobrej zhody, testom pomeru rozsahu k štandardnej odchýlke (R/s test) alebo Shapiro-Wilkovým testom (dvojstranný, $p \leq 0{,}05$). Na testovanie homogenity variancie sa môže použiť Cochranov test, Levenov test alebo Barlettov test (dvojstranný, $p \leq 0{,}05$). Ak sú splnené požiadavky postupov parametrických testov (normalita, homogenita variancie), môže sa vykonať jednostranná analýza variancie (ANOVA) a následné testy viacnásobného porovnania. Viacnásobné porovnania (napr. Dunnettov t-test) alebo testy zmiernenia trendu (napr. Williamsov test v prípade monotónneho vzťahu dávky a reakcie) sa môžu použiť na výpočet, či existujú výrazné rozdiely ($p \leq 0{,}05$) medzi kontrolnými vzorkami a vzorkami s rôznymi koncentráciami testovanej chemikálie (výber odporúčaných testov podľa dokumentu OECD 54 ‚Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návod na uplatňovanie'). Inak by sa na stanovenie koncentrácií NOEC a LOEC mali použiť neparametrické metódy (napr. Bonferroniho U-test podľa Holma alebo Jonckheereho-Terpstrov test trendu).

Limitný test

39. Ak sa vykonal limitný test (porovnanie kontrolnej vzorky a len jednej vzorky s aplikovanou chemikáliou) a ak sú splnené požiadavky postupov parametrických testov (normalita, homogenita), metrické reakcie je možné hodnotiť pomocou Studentovho testu (t-test). Ak tieto požiadavky nie sú splnené, je možné použiť t-test nerovnakej variancie (Welchov t-test) alebo neparametrický test, ako napríklad Mannov-Whitneyho U-test.

40. S cieľom určiť významné rozdiely medzi kontrolnými vzorkami (kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom) sa môžu replikáty každej kontrolnej vzorky testovať tak, ako je uvedené pre limitný test. V prípade, že sa týmito testami nezistia významné rozdiely, všetky replikáty kontrolných vzoriek a kontrolných vzoriek s rozpúšťadlom sa môžu spojiť. Inak by sa mali všetky vzorky s aplikovanou chemikáliou porovnať s kontrolnými vzorkami s rozpúšťadlom.

Protokol o skúške

41. Protokol o skúške by mal obsahovať prinajmenšom tieto informácie:

— *Testovaná chemikália*

  — identita testovanej chemikálie, názov, číslo šarže, číslo dávky a číslo CAS, čistota,

  — fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie (napr. log K_{ow}, rozpustnosť vo vode, tlak pary, Henryho konštanta (H), a pokiaľ možno, informácie o osude testovanej chemikálie v pôde).

— *Testované organizmy*

  — identifikácia a dodávateľ testovaných organizmov, opis podmienok kultivácie,

  — vekový rozsah testovaných organizmov.

— *Podmienky testu*

— opis koncepcie experimentu a postupu,

— podrobnosti o príprave testovacej pôdy, podrobnosti o príprave testovacej pôdy; podrobné špecifikácie, ak sa použila prírodná pôda (pôvod, história, rozdelenie veľkosti častíc, pH, obsah organickej hmoty a klasifikácia pôdy, ak je k dispozícii),

— maximálna kapacita zadržiavania vody v pôde,

— opis metódy, ktorá sa použila na aplikáciu testovanej chemikálie do pôdy,

— údaje o pomocných chemikáliách použitých na podávanie testovanej chemikálie,

— veľkosť testovacích nádob a suchá hmotnosť testovacej pôdy na jednu nádobu,

— podmienky testu: intenzita svetla, trvanie cyklov svetla a tmy, teplota,

— opis kŕmneho režimu, druh a množstvo potravy, ktorá sa používala v rámci testu, dátumy kŕmenia,

— hodnoty pH a obsah vody v pôde na začiatku a počas testu (kontrolné vzorky a každá vzorka s aplikovanou chemikáliou),

— podrobný opis metódy extrakcie a účinnosti extrakcie.

— *Výsledky testu*

— počet juvenilných jedincov stanovený v každej testovacej nádobe na konci testu,

— počet dospelých samičiek a mortalita dospelých jedincov (%) v každej testovacej nádobe na konci testu,

— opis zjavných príznakov alebo výrazných zmien v správaní,

— výsledky získané s referenčnými vzorkami testovanej chemikálie,

— súhrnné štatistické údaje (EC_x a/alebo NOEC) vrátane 95 % hranice spoľahlivosti a opis metódy výpočtu,

— krivka závislosti veličiny od koncentrácie.

— Uvedú sa odchýlky od postupov opísaných v tejto testovacej metóde a všetky nezvyčajné udalosti počas testu.

LITERATÚRA

1. Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21-46.

2. Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259-274.

3. Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS – Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

4. Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

5. Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492

6. Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: p 241-249.

7. Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.

8. Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

9. Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

10. Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

11. Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.

12. Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.

13. Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.

14. ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

15. Chapter C.8 of this Annex -. Toxicity for Earthworms..

16. EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

17. ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

18. Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

19. Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

20. Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.

21. Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

22. Chapter C.32 of this Annex- Enchytraeid reproduction test.

23. ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

24. Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

25. Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

26. Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with ‚good genes' in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

27. Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

28. Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

29. Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

30. Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

31. OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO (2006)18

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov (v rámci tohto testu sa všetky účinné koncentrácie vyjadrujú ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy):

Chemikália je látka alebo zmes.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa nepozoruje žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného expozičného času v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

LOEC (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom) je najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá má štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného času expozície v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

EC_x (účinná koncentrácia x %) je koncentrácia, ktorá v rámci stanoveného času expozície vyvolá účinok x % na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Napríklad EC_{50} je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že v stanovenom čase expozície vyvolá účinok na výsledok testu pri 50 % exponovanej populácie.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Dodatok 2

Stanovenie maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde

Táto metóda stanovenia maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde sa považuje za vhodnú. Opísaná je v prílohe C normy ISO DIS 11268-2 [Kvalita pôdy – účinky znečisťujúcich látok na dážďovky (*Eisenia fetida*), časť 2: Part 2: Stanovenie účinkov na reprodukciu (23)].

Pomocou vhodného zariadenia na odber vzoriek (špirálová trubica atď.) sa odoberie určené množstvo (napr. 5 g) testovacieho pôdneho substrátu. Spodná časť trubice sa zakryje kúskom filtračného papiera a po naplnení vodou sa umiestni na stojan vo vodnom kúpeli. Trubica by sa mala postupne ponárať do vody, až kým vodná hladina nestúpne nad vrchnú vrstvu pôdy. Potom by sa mala nechať vo vode približne tri hodiny. Keďže nie všetka voda, ktorú absorbujú kapiláry pôdy, sa môže zachovať, vzorke pôdy by sa malo umožniť odvodnenie počas dvoch hodín tak, že sa trubica uloží na vrstvu veľmi mokrého jemne drveného kremenného piesku v uzavretej nádobe (aby sa zabránilo vysúšaniu). Vzorka by sa potom mala odvážiť a vysušiť na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kapacitu zadržiavania vody (WHC) je možné vypočítať takto:

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

kde:

S = vodou saturovaný substrát + hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera,

T = hmotnosť obalu (hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera),

D = suchá hmotnosť substrátu.

Dodatok 3

Stanovenie pH pôdy

Táto metóda stanovenia pH pôdy je založená na opise uvedenom v norme ISO DIS 10390: Kvalita pôdy – stanovenie pH (16).

Určené množstvo pôdy sa suší pri teplote miestnosti najmenej 12 hodín. Potom sa vytvorí suspenzia pôdy (obsahujúca najmenej 5 g pôdy) s päťnásobným objemom 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) analytickej čistoty alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) analytickej čistoty. Suspenzia sa následne päť minút dôkladne pretrepáva a potom sa nechá stáť najmenej 2 hodiny, ale nie dlhšie ako 24 hodín. Hodnota pH kvapalnej fázy sa potom meria pH metrom, ktorý sa pred každým meraním kalibruje pomocou vhodnej série tlmivých roztokov (napr. s pH 4,0 a 7,0).

Dodatok 4

Chov druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, potravinové roztoče a synchronizácia kultúry

Chov druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:

Kultúry sa môžu uchovávať v plastových nádobách alebo sklených pohároch naplnených zmesou sadry a prášku z dreveného uhlia (9: 1). Sadra sa môže udržiavať vo vlhkom stave pridaním niekoľkých kvapiek destilovanej alebo deionizovanej vody, ak je to potrebné. Optimálna teplota na chov je 20 °C ± 2 °C, režim svetla a tmy nie je pre tento druh dôležitý. Korisťou môžu byť roztoče druhu *Typrophagus putrescentiae* alebo *Caloglyphus* sp. (s potravinovými roztočmi by sa malo zaobchádzať opatrne, lebo môžu spôsobovať alergie u ľudí), ale ako korisť sú vhodné aj háďatká, červy čeľade *Enchytraeidae* a chvostoskoky. Ich zdroje by sa mali zaznamenať. Vývoj populácie sa môže začať s jednou samičkou, lebo samčekovia sa vyvíjajú v neoplodnených vajíčkach. Generácie sa do značnej miery prekrývajú. Samička môže žiť najmenej 100 dní a môže počas svojho života naklásť približne 100 vajíčok. Najvyššiu mieru kladenia vajíčok dosahujú samičky v období 10 – 40 dní (odkedy dospejú) a dosahuje hodnotu až 2,2 vajíčka na samičku^{-1} a deň$^{-1}$. Čas vývoja od vajíčka po dospelú samičku je približne 20 dní pri teplote 20 °C. Pred začiatkom tohto vývoja by sa malo založiť a udržiavať viac kultúr.

Chov druhu *Typrophagus putrescentiae*:

Roztoče sa uchovávajú v sklenej nádobe naplnenej jemným práškovým pivovarníckym droždím, ktorá sa vloží do plastového vedra naplneného roztokom KNO_3 s cieľom zabrániť úniku. Potravinové roztoče sa umiestnia na vrch tohto prášku. Potom sa pomocou lopatky opatrne zmiešajú s práškom (ktorý sa má vymeniť dvakrát týždenne).

Synchronizácia kultúry:

Exempláre, ktoré sa používajú v rámci testu, by mali približne rovnako staré (asi sedem dní po dosiahnutí štádia dospelosti). Pri teplote chovu 20 °C sa to dosiahne týmto postupom:

Samičky sa presunú do čistej chovnej nádoby a poskytne sa im dostatočné množstvo potravy.

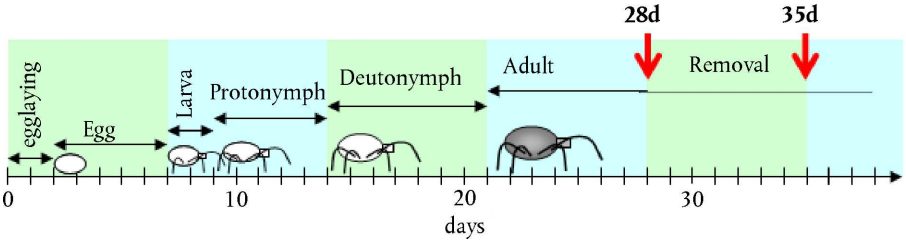
— Poskytnú sa im dva až tri dni na kladenie vajíčok, potom sa samičky premiestnia.

— Dospelé samičky sa použijú na testovanie medzi 28. a 35. dňom od začiatku ich umiestňovania do čistých chovných nádob.

Dospelé samičky je možné ľahko odlíšiť od samčekov aj od ostatných vývojových štádií podľa ich väčších rozmerov, oblejšieho tvaru a hnedého chrbtového štítu (samčekovia sú štíhlejší a plochí, nedospelé jedince sú bielej až krémovej farby). Vývoj roztočov prebieha pri teplote 20 °C približne podľa uvedenej schémy (obrázok): vajíčko päť dní, larva dva dni, protonymfa päť dní, deutonymfa sedem dní, obdobie samičky pred kladením vajíčok dva dni. Potom sú roztoče dospelé.

Obrázok

vývoj roztočov druhu *Hypoaspis aculeifer (Geolaelaps)* pri teplote 20 °C. [premiestnenie = samičky sa použijú na test]



Dospelé testované živočíchy sa premiestnia zo synchronizovanej kultúry do testovacích nádob medzi 28. a 35. dňom od okamihu, keď rodičovské samičky začali klásť vajíčka (t. j. 7 – 14 dní po dosiahnutí štádia dospelosti). Tým sa zabezpečí, že testované živočíchy už prešli obdobím pred kladením vajíčok a spárili sa so samčekmi, ktoré sú takisto prítomné v kultivačnej nádobe. Pozorovania laboratórnych kultúr naznačujú, že samičky sa pária ihneď alebo krátko po dosiahnutí štádia dospelosti, ak sú prítomní samčekovia (Ruf, Vaninnen, osobné pozorovania). Obdobie siedmich dní bolo stanovené s cieľom uľahčiť zapojenie do laboratórnej rutiny a utlmiť individuálne vývojové rozdiely medzi roztočmi. Kladenie vajíčok by sa malo začať prinajmenšom s rovnakým počtom samičiek, aký je prípadne potrebný na test (ak je na test potrebných napr. 400 samičiek, najmenej 400 samičkám by sa malo umožniť klásť vajíčka dva až tri dni). Počiatočnou hranicou pre synchronizovanú populáciu by malo byť najmenej 1 200 vajíčok (pomer pohlaví približne 0,5, mortalita približne 0,2). Na prevenciu kanibalizmu je prijateľnejšie ponechať v jednej nádobe najviac 20 – 30 samičiek kladúcich vajíčka.

Dodatok 5

Metódy extrakcie

V prípade mikroskopických článkonožcov je vhodnou metódou na oddelenie exemplárov od pôdy/substrátu tepelná extrakcia (pozri obrázok). Táto metóda je založená na aktivite organizmov, takže len mobilné exempláre budú mať šancu byť zaznamenané. Princípom tepelnej extrakcie je vytvoriť pre organizmy postupne sa zhoršujúce podmienky vo vzorke, takže opustia substrát a spadnú do fixačnej kvapaliny (napr. etanolu). Kľúčovými bodmi sú trvanie extrakcie a gradient prechodu od dobrých cez stredné až po zlé podmienky pre organizmy. Trvanie extrakcie na ekotoxikologické testy musí byť čo najkratšie, lebo akýkoľvek rast populácie počas extrakcie by skreslil výsledky. Na druhej strane podmienky teploty a vlhkosti vo vzorke musia byť vždy v rozsahu, ktorý umožňuje roztočom pohybovať sa. Zahrievanie vzorky pôdy vedie k vysychaniu substrátu. Ak je vysychanie príliš rýchle, niektoré roztoče môžu tiež vyschnúť skôr, ako sa im podarí uniknúť.

Preto sa navrhuje tento postup (24), (25):

Zariadenie: Tullgrenov lievik alebo porovnateľné metódy, ako napríklad McFadyenova (zahrievanie zhora, vzorka sa dáva nad lievik).

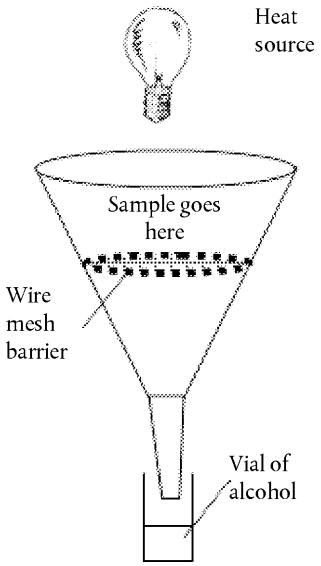
Režim zahrievania: 25 °C počas 12 hodín, 35 °C počas 12 hodín, 45 °C počas 24 hodín (spolu 48 hodín). Teplota by sa mala merať v substráte.

Fixačná kvapalina: 70 % etanol.

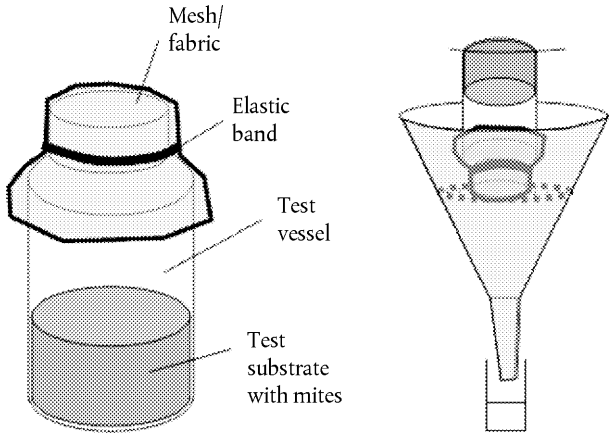
Postup: Zoberie sa sklená nádobka, ktorá sa používala v rámci testu. Odoberie sa uzáver a okolo otvoru sa omotá kus sieťky alebo tkaniny. Tkanina by mala mať veľkosť ôk 1,0 – 1,5 mm. Tkanina sa upevní elastickou páskou. Nádobka sa opatrne otočí hore dnom a vloží do extrakčného zariadenia. Tkanina bráni substrátu, aby vytiekol do fixačnej kvapaliny, ale umožňuje roztočom opustiť vzorku. Po vložení všetkých nádobiek sa začne režim zahrievania. Extrakcia sa skončí po 48 hodinách. Fixačné nádobky sa vyberú zo zariadenia a roztoče sa spočítajú pomocou preparačného mikroskopu.

Účinnosť zvolenej metódy extrakcie sa musí overovať raz alebo dvakrát ročne s použitím nádob obsahujúcich známy počet juvenilných a dospelých roztočov v testovacom substráte bez aplikovanej chemikálie. Účinnosť extrakcie by mala byť v priemere ≥ 90 % kombinovane pre všetky vývojové štádiá.

Tullgrenovo extrakčné zariadenie



Ako sa pripraví testovacia nádobka po skončení testu, pred extrakciou.



Dodatok 6

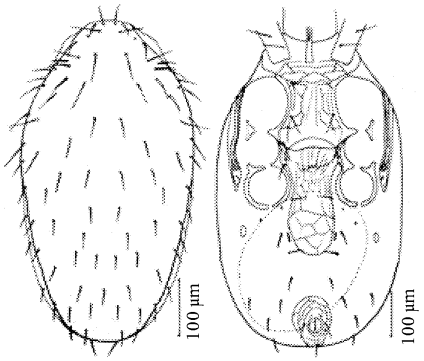
Identifikácia druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Podtrieda/rad/podrad:	Čeľaď:	Rod/podrod/druh:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

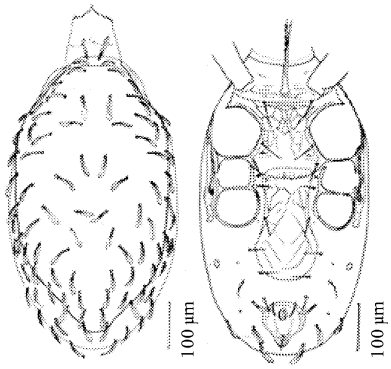
Autor a dátum:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23. január 2007

Použitá literatúra:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A. M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

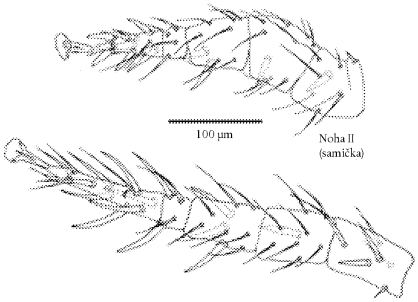
Deterministické vlastnosti:	tektum so zaobleným zúbkovaným okrajom, ryhovaný hypostom s viac ako 6 zúbkami, nie veľmi dlhé zadné chrbtové štetiny Z4, chrbtové štetiny, nie veľmi zväčšený normálny genitálny štít, ktorý nesiaha po análny štít, zadná polovica chrbtového štítu bez nespárovaných štetín, nohy II a IV s hrubými makroskopickými štetinami, chrbtové štetiny Z5 približne dvakrát dlhšie než J5, pevné články klepietok s 12 – 14 zubami a pohyblivé články s 2 zubami, zadná časť tela dlhá 520 – 685 µm. Druh *Hypoaspis miles* sa tiež používa v oblasti biologickej kontroly a mohlo by dôjsť k jeho zámene s druhom *H. aculeifer*. Hlavný rozdiel: *H. miles* patrí k podrodu *Cosmolaelaps* a má nožovité chrbtové štetiny, zatiaľ čo *H. aculeifer* patrí k podrodu *Geolaelaps* a má chĺpkovité chrbtové štetiny.



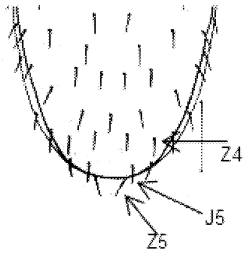
Hypoaspis aculeifer podľa: Hughes, 1976



Hypoaspis miles podľa: *Hughes*, 1976



Originálny nákres: F. Faraji



Hypoaspis aculeifer, chrbtový štít s charakteristickými štetinami

Dodatok 7

Základné informácie o biológii druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Druh *Hypoaspis aculeifer* patrí do čeľade *Lealapidae*, podtriedy *Acari* (roztoče), triedy *Arachnida*, kmeňa *Arthropoda*. Roztoče žijú vo všetkých druhoch pôdy a živia sa inými roztočmi, háďatkami a chvostoskokmi (26). V prípade nedostatku potravy prejdú na kanibalizmus (27). Telo predátorských roztočov sa delí na dve časti, idiosoma (zadná časť tela) a gnathosoma (predná časť tela). Jasné rozdelenie idiosomy na prosoma (hlavohruď) a opisthosoma (brucho) chýba. Gnathosoma obsahuje nástroje na kŕmenie, ako napríklad tykadlá (palps) a klepietka (chelicery). Klepietka sa delia na tri časti a sú vybavené ostňami rôznych tvarov. Samčekovia využívajú klepietka okrem požívania potravy najmä na prenos svojich spermatických váčkov na samičky. Chrbtový štít pokrýva takmer úplne idiosoma. Veľkú časť idiosoma pri samičkách zaberajú rozmnožovacie orgány, ktoré sú obzvlášť zreteľné krátko pred ukladaním vajíčka. V brušnej časti sa nachádzajú dva štíty, hrudný a genitálny. Všetky nohy sú vybavené štetinami a ostňami. Štetiny sa používajú na uchytenie pri pohybe v pôde alebo na nej. Prvý pár nôh sa používa predovšetkým ako anténa. Druhý pár nôh sa používa nielen na pohyb, ale aj na zovretie koristi. Ostne na štvrtom páre nôh môžu slúžiť na obranu, a tiež ako pohon (28). Samčekovia sú dlhí 0,55 – 0,65 mm a majú hmotnosť 10 – 15 µg. Samičky sú dlhé 0,8 – 0,9 mm a vážia 50 – 60 µg (8) (28) (obr. 1).

Obrázok 1

Samička, samček, protonymfa a larva druhu H. aculeifer.

Pri teplote 23 °C roztoče pohlavne dozrievajú po 16 dňoch (samičky) a po 18 dňoch (samčekovia) (6). Samičky prenesú spermie pomocou solenostoma, odkiaľ sa presunú k vajíčku. Vo vajíčku spermie dozrejú a uchovajú sa tam. K oplodneniu dochádza, až keď spermie vo vajíčku dozrejú. Oplodnené alebo neoplodnené vajíčka budú uložené pri samičkách v zhlukoch alebo oddelene, prevažne v prasklinách alebo otvoroch. Samičky môžu po párení nosiť juvenilných jedincov oboch pohlaví, zatiaľ čo z vajíčok samičiek, ktoré sa nepárili, sa môžu vyliahnuť výlučne samčí juvenilní jedinci. Počas vývoja k dospelosti prechádzajú roztoče štyrmi vývojovými fázami (vajíčko – larva, larva – protonymfa, protonymfa – deutonymfa, deutonymfa – dospelosť).

Vajíčko je mliečne biele, sklovité, elipsovité a približne 0,37 mm dlhé, s pevným plášťom. Podľa literatúry (8) majú larvy veľkosť 0,42 – 0,45 mm. Majú len tri páry nôh. V oblasti hlavy sa vyvíjajú tykadlá a klepietka. Na klepietkach je niekoľko malých zúbkov, ktoré sa používajú na liahnutia z vajíčka. Po prvom lienení, jeden až dva dni po vyliahnutí, sa vyvinie protonymfa. Tiež sú biele, majú veľkosť 0,45 – 0,62 mm (8) a štyri páry nôh. Zuby na klepietkach sú už úplne vyvinuté. Začínajúc týmto štádiom roztoče začínajú zháňať potravu. Z tohto dôvodu roztoč klepietkom prepichne kutikulu koristi a vstrekne do nej sekréty na trávenie. Vzniknutú kašu potom môže roztoč vysať. Klepietka sa môžu použiť aj na odtrhnutie väčších častíc z hrudiek potravy (28). Po jednom ďalšom lienení sa vyvinú deutonymfy. Sú 0,60 – 0,80 mm (8) veľké a majú žltú až svetlohnedú farbu. Od tejto fázy je možné ich rozdeliť na samičky a samčekov. Po ďalšom zvlečení, keď sú živočíchy neaktívne a vyvíja sa im hnedý štít (približne po 14 dňoch), sú roztoče dospelé (28) (29) (30). Ich životnosť je medzi 48 a 100 dní pri teplote 25 °C (27).

Dodatok 8

Zhrnutie a harmonogram hlavných opatrení, ktoré sa majú prijať s cieľom vykonať test s rodom *Hypoaspis*

Čas (dni) začiatok testu = 0. deň	Činnosť/úloha
– 35. deň až – 28. deň	Samičky sa premiestnia zo zásobnej kultúry do čistých nádob, aby sa začala synchronizácia o 2 dni neskôr: premiestnenie samičiek dvakrát alebo trikrát do týždňa: poskytovať dostatok potravy
– 5. deň (+/- 2)	príprava umelej pôdy
– 4. deň (+/- 2)	stanovenie kapacity zadržiavania vody (WHC) umelo pripravenej pôdy sušenie počas noci nasledujúci deň: odvážia sa vzorky a vypočíta WHC
– 4. deň (+/- 2)	umelo pripravená pôda sa predvlhčí, aby sa dosiahla vlhkosť 20 – 30 % WHC
0. deň	začiatok testu: do umelo pripravenej pôdy sa pridá testovaná chemikália do každého replikátu sa vloží desať samičiek každý replikát sa odváži pripravia sa abiotické kontrolné vzorky na obsah vlhkosti a pH, 2 replikáty pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou vlhké kontrolné vzorky sa počas noci vysušia nasledujúci deň: odvážia sa vlhké kontrolné vzorky nasledujúci deň: odmeria sa pH vysušených abiotických kontrolných vzoriek
3., 6., 9., 12. deň (približne)	do každého replikátu sa pridá dostatočné množstvo organizmov ako koristi každý replikát sa odváži, prípadne sa doplní odparená voda
14. deň	ukončí sa test, začne sa extrakcia všetkých replikátov a kontrola účinnosti extrakcie počas noci sa vysuší obsah vody kontrolných vzoriek nasledujúci deň: odváži sa obsah vody v kontrolných vzorkách nasledujúci deň: odmeria sa pH vysušených kontrolných vzoriek
16. deň	ukončí sa extrakcia
po 16. dni	zaznamená sa počet dospelých a juvenilných jedincov vo vybratom materiáli výsledky sa uvedú do vzorovej tabuľky do hárkov protokolu o skúške sa zapíše postup testovania

C.37. 21-DŇOVÝ TEST NA RYBÁCH: KRÁTKODOBÝ SKRÍNING ESTROGÉNNEHO A ANDROGÉNNEHO PÔSOBENIA A INHIBÍCIA AROMATÁZY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 230 (2009). Potreba vypracovať a validovať test na rybách, schopný odhaliť určité chemikálie s účinkom na endokrinný systém, vychádza z obavy, že úroveň týchto chemikálií v životnom prostredí môže mať škodlivé účinky na ľudí aj na voľne žijúce živočíchy v dôsledku pôsobenia týchto chemikálií na endokrinný systém. Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala činnosť s vysokou prioritou s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie skríningu a testov potenciálnych endokrinných disruptorov. Jednou zložkou tejto aktivity bolo vypracovať usmernenie na vykonávanie testov pre skríning chemikálií s účinkom na endokrinný systém určitých druhov rýb. Tento 21-dňový skríningový test endokrinného systému rýb bol podrobený rozsiahlemu programu validácie, ktorý pozostával z medzilaboratórnych štúdií s vybratými chemikáliami s cieľom preukázať význam a spoľahlivosť testu na zisťovanie chemikálií s estrogénnym pôsobením a spôsobujúcich inhibíciu aromatázy (1, 2, 3, 4, 5) na troch druhoch skúmaných rýb (čerebľa potočná, medaka japonská a dánio pruhované). Androgénne pôsobenie je možné zisťovať pri čerebli potočnej a medake japonskej, ale nie pri dániu pruhovanom. Táto testovacia metóda neumožňuje zisťovanie anti-androgénnych chemikálií. Postup validácie bol podrobený partnerskému preskúmaniu skupinou odborníkov nominovaných národnými koordinátormi programu usmernení na vykonávanie testov (6). Tento test nie je určený na identifikáciu špecifických mechanizmov hormonálneho narušenia, lebo testovacie živočíchy majú intaktnú os hypotalamus – hypofýza – gonády (HHG), ktorá môže reagovať na ovplyvňujúce chemikálie na rôznych úrovniach. Krátkodobý reprodukčný test na rybách (OECD TG 229) zahŕňa fekunditu a v prípade potreby histopatológiu gonád čereble potočnej, ako aj všetky parametre uvedené v tejto testovacej metóde. Usmernenie OECD TG 229 umožňuje skríning chemikálií, ktoré ovplyvňujú reprodukciu prostredníctvom rôznych mechanizmov vrátane endokrinných modalít. Toto by sa malo zvážiť pred výberom najvhodnejšej testovacej metódy.

2. Táto testovacia metóda opisuje skríningový test *in vivo*, v rámci ktorého sa pohlavne dospelí samčekovia a neresiace sa samičky rýb držia spolu a vystavia sa pôsobeniu chemikálie počas obmedzenej etapy ich životného cyklu (21 dní). Po ukončení 21-dňovej expozície sa pri samčekoch a samičkách merajú v závislosti od použitého druhu jeden alebo dva biomarkerové parametre ako indikátory estrogénneho alebo androgénneho pôsobenia a inhibície aromatázy testovanej chemikálie. Týmito parametrami sú vitelogenín a sekundárne pohlavné znaky. Vitelogenín sa meria pri čerebli potočnej, medake japonskej a dániu pruhovanom, zatiaľ čo sekundárne pohlavné znaky iba pri čerebli potočnej a medake japonskej.

3. Tento biologický test slúži ako skríningový test *in vivo* pre určité endokrinné mechanizmy pôsobenia a jeho použitie je potrebné posudzovať v kontexte ‚Koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov' (28).

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. Vitelogenín sa spravidla vytvára v pečeni samičiek vajcorodých stavovcov ako reakcia na cirkulujúci endogénny estrogén. Je to prekurzor proteínov vaječného žĺtka a po vzniku v pečeni sa krvným obehom dostáva k vaječníkom, ktoré ho prijmú a modifikujú v procese tvorby vajíčok. Vitelogenín takmer nie je možné zistiť v plazme nedospelých samičiek a samčekov rýb, pretože nemajú dostatok cirkulujúceho estrogénu. Ich pečeň je však schopná syntetizovať a vylučovať vitelogenín v reakcii na stimuláciu exogénnym estrogénom.

5. Meranie vitelogenínu slúži na zisťovanie chemikálií s rôznymi estrogénnymi mechanizmami pôsobenia. Estrogénne chemikálie je možné zisťovať prostredníctvom merania indukcie vitelogenínu v telách samčekov rýb, čo bolo veľakrát zdokumentované v partnersky preskúmanej vedeckej literatúre [napr. (7)]. Indukcia vitelogenínu sa preukázala aj po vystavení pôsobeniu aromatizovateľných androgénov (8), (9). Zníženie úrovne cirkulácie estrogénu v telách samičiek, napríklad v dôsledku inhibície aromatázy konverziou endogénneho androgénu na prírodný estrogén 17β-estradiol, spôsobuje pokles úrovne vitelogenínu, ktorý sa používa na zisťovanie chemikálií s vlastnosťami inhibície aromatázy (10), (11). Biologický význam reakcie vitelogenínu na estrogénne pôsobenie a inhibíciu aromatázy je vo veľkej miere zdokumentovaný. Je však možné, že tvorbu vitelogenínu v telách samičiek môže ovplyvňovať aj všeobecná toxicita a iné ako endokrinné toxické mechanizmy pôsobenia, napríklad hepatotoxicita.

6. Viaceré metódy merania boli úspešne vyvinuté a štandardizované na bežné použitie. Ide o druhovo špecifické metódy enzýmového imunosorbentového stanovenia (ELISA) používajúce imunochémiu na kvantifikáciu vitelogenínu produkovaného v malých vzorkách krvi alebo pečene odobratých z jednotlivých rýb (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18). Na meranie vitelogenínu sa odoberajú vzorky krvi čereble potočnej, krvi alebo homogenátu z hlavy/chvosta dánia pruhovaného a pečene medaky japonskej. V prípade medaky japonskej existuje dobrá korelácia medzi vitelogenínom meraným z krvi a z pečene (19). V dodatku 6 sú uvedené odporúčané postupy pre odber vzoriek na analýzu vitelogenínu. Súpravy na meranie vitelogenínu sú bežne dostupné, pričom by tieto súpravy mali byť založené na validovanej druhovo špecifickej metóde ELISA.

7. Sekundárne pohlavné znaky samčekov niektorých druhov rýb sú zvonku viditeľné, kvantifikovateľné a citlivé na cirkulujúce úrovne endogénnych androgénov. Týka sa to čereble potočnej a medaky japonskej, ale nie dánia pruhovaného, ktorý nemá kvantifikovateľné sekundárne pohlavné znaky. Samičky si udržiavajú schopnosť vývoja samčích sekundárnych pohlavných znakov, ak sú vystavené pôsobeniu androgénnych chemikálií vo vode. Vo vedeckej literatúre sú k dispozícii viaceré štúdie dokumentujúce tento typ reakcie pri jedincoch druhu čereble potočnej (20) a medaky japonskej (21). Interpretácia úbytku sekundárnych pohlavných znakov pri samčekoch by mala byť opatrná vzhľadom na nízku štatistickú významnosť a mala by byť založená na odbornom posudku a závažnosti dôkazov. Použitie dánia pruhovaného v rámci tohto testu je obmedzené, keďže nemá kvantifikovateľné sekundárne pohlavné znaky citlivé na androgénne účinky chemikálií.

8. V prípade čereble potočnej je hlavným ukazovateľom pôsobenia exogénneho estrogénu počet výrastkov (tuberkulov) nachádzajúcich sa na ústach samičiek rýb. V prípade medaky japonskej predstavuje hlavný marker exogénneho pôsobenia androgénnych chemikálií na samičky rýb počet papilárnych procesov. V dodatkoch 5A a 5B sú uvedené odporúčané postupy, ktoré treba dodržiavať v prípade hodnotenia pohlavných znakov čereble potočnej, resp. medaky japonskej.

9. Vymedzenie pojmov použité v rámci tejto testovacej metódy je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

10. V rámci testu sa samčekovia a samičky rýb v reprodukčnom stave spoločne vystavia pôsobeniu chemikálie v testovacích nádobách. Ich stav dospelosti a reprodukčný stav umožňuje jasné rozlíšenie obidvoch pohlaví, a teda analýzu každého parametra s ohľadom na pohlavie, a zabezpečuje ich citlivosť na exogénne chemikálie. Po ukončení testu sa pohlavie potvrdí makroskopickým skúmaním gonád po ventrálnom otvorení brušnej dutiny nožnicami. Prehľad príslušných podmienok biologického testu je uvedený v dodatku 2. Test sa spravidla začína výberom vzorky rýb z populácie, ktorá je v stave neresenia, pričom by sa nemali používať senescentné živočíchy. Usmernenie týkajúce sa veku rýb a ich reprodukčného stavu sa uvádza v časti o výbere rýb. Test sa vykonáva s použitím troch expozičných koncentrácií chemikálie, ako aj s kontrolnou vzorkou vody, a ak je to potrebné, s kontrolnou vzorkou obsahujúcou rozpúšťadlo. V prípade medaky japonskej a dánia pruhovaného sa používajú dve nádoby alebo dva replikáty na jednu vzorku s aplikovanou chemikáliou (každá nádoba obsahuje päť samčekov a päť samičiek), zatiaľ čo v prípade čereble potočnej sa používajú štyri nádoby alebo replikáty na jednu vzorku s aplikovanou chemikáliou (každá nádoba obsahuje dvoch samčekov a štyri samičky). Ide o zohľadnenie teritoriálneho správania samčekov čereble potočnej pri súčasnom zachovaní dostatočnej významnosti testu. Expozícia trvá 21 dní a odber vzoriek rýb sa vykoná v 21. deň expozície.

11. Pre odber vzoriek v 21. deň sa všetky živočíchy usmrtia humánnym spôsobom. Druhotné pohlavné znaky sa zisťujú pri čerebli potočnej a medake japonskej (pozri dodatok 5A a dodatok 5B). Na stanovenie vitelogenínu v tele dánia pruhovaného a čereble potočnej sa odoberú vzorky krvi, pričom alternatívne sa na stanovenie vitelogenínu v tele dánia pruhovaného môžu odobrať hlavy/chvosty (dodatok 6). Na analýzu vitelogenínu v tele medaky japonskej sa odoberie pečeň (dodatok 6).

KRITÉRIÁ PRIJATEĽNOSTI TESTU

12. Na to, aby boli výsledky testu prijateľné, musia byť splnené tieto podmienky:

— úmrtnosť v kontrolných vzorkách s vodou (alebo s rozpúšťadlom) na konci obdobia expozície by nemala prekročiť hodnotu 10 %,

— koncentrácia rozpusteného kyslíka by mala počas expozície dosahovať najmenej 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka,

— teplota vody by sa v žiadnom okamihu počas expozície nemala líšiť o viac ako ± 1,5 °C medzi testovacími nádobami a mala by sa udržiavať v rozsahu 2 °C v rámci teplotných rozsahov špecifikovaných pre daný testovací druh (dodatok 2),

— malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ± 20 % stredných nameraných hodnôt.

OPIS METÓDY

Zariadenie

13. Obvyklé laboratórne vybavenie a najmä tieto zariadenia:

a) zariadenie na meranie kyslíka a pH meter;

b) zariadenie na stanovenie tvrdosti a alkality vody;

c) vhodné zariadenie na reguláciu teploty a podľa možnosti na kontinuálne monitorovanie;

d) nádrže z chemicky inertného materiálu a s vhodným objemom v súvislosti s odporúčanou veľkosťou násady a chovnou hustotou (pozri dodatok 2);

e) substrát na neresenie pre čerebľu potočnú a dánio pruhované (potrebné údaje sú uvedené v dodatku 4);

f) vhodné presné váhy (t. j. s presnosťou do ± 0,5 mg).

Voda

14. Použiteľná voda na testovvanie je každá voda, v ktorej testovací druh vykazuje vhodné dlhotrvajúce prežívanie a rast. Mala by mať konštantnú kvalitu počas celého testu. Hodnota pH vody by mala byť v rozsahu 6,5 – 8,5, ale počas daného testu by mala byť v rozsahu ± 0,5 jednotky pH. S cieľom zabezpečiť, aby riediaca voda nemala prílišný vplyv na výsledok testu (napr. tvorbou komplexu testovanej chemikálie), by sa vzorky mali odoberať v intervaloch počas analýzy. Ak je známe, že riediaca voda bude mať pomerne konštantnú kvalitu, zisťovanie ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} a $SO4^{2-}$), pesticídov (napr. celkového obsahu organofosforečných a organochlórových pesticídov), celkového organického uhlíka a suspendovaných tuhých látok by sa malo vykonávať napríklad každé tri mesiace. Ak sa preukázalo, že kvalita vody je stabilná najmenej počas jedného roka, merania sa môžu vykonávať menej často a časové intervaly medzi nimi sa môžu predĺžiť (napr. každých šesť mesiacov). Niektoré chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie sú uvedené v zozname v dodatku 3.

Testovacie roztoky

15. Testovacie roztoky vybratých koncentrácií sa pripravujú riedením zásobných roztokov. Zásobný roztok by sa mal podľa možností pripraviť jednoduchým miešaním alebo trepaním testovanej chemikálie v riediacej vode mechanickým prostriedkom (napr. miešadlom alebo ultrazvukom). Na dosiahnutie vhodne koncentrovaných zásobných roztokov sa môžu použiť saturačné kolóny (rozpúšťacie kolóny). Použitie rozpúšťadla ako nosiča sa neodporúča. Ak je však rozpúšťadlo potrebné, mali by sa súbežne pripraviť kontrolné vzorky s rozpúšťadlom, s rovnakou koncentráciou rozpúšťadla, aká je vo vzorkách s aplikovanou chemikáliou. V prípade zložitých testovaných chemikálií môže byť rozpúšťadlo technicky najlepším riešením, je však potrebné riadiť sa usmerňovacím dokumentom OECD o testovaní toxicity zložitých látok a zmesí vo vodnom prostredí (22). Výber rozpúšťadla bude daný chemickými vlastnosťami chemikálie. V usmerňovacom dokumente OECD sa odporúča maximálna hodnota 100 µl/l, ktorá by sa mala dodržiavať. Nedávny prieskum (23) však poukázal na ďalšie problémy pri používaní rozpúšťadiel v rámci testovania endokrinného pôsobenia. Preto sa v prípadoch, keď je použitie rozpúšťadla potrebné, odporúča minimalizovať jeho koncentráciu všade tam, kde je to technicky možné (v závislosti od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie).

16. Používať sa bude prietokový testovací systém. Takýmto systémom sa kontinuálne rozdeľuje a riedi zásobný roztok testovanej chemikálie (napr. dávkovacími meracími čerpadlami, proporcionálnym zriedovačom, saturačným systémom) s cieľom dodať rad koncentrácií do testovacích komôr. Prietoky zásobných roztokov a riediacej vody by sa mali počas testu kontrolovať v intervaloch, najlepšie denne, a ich hodnoty by sa nemali v priebehu celého testu meniť o viac ako 10 %. Pozornosť by sa mala venovať tomu, aby sa nepoužívali potrubia z plastov s nízkym stupňom kvality alebo z iných materiálov, ktoré môžu obsahovať biologicky aktívne chemikálie. Pri výbere materiálu na prietokový systém by sa mala zvážiť možná adsorpcia testovanej chemikálie na tento materiál.

Uchovávanie rýb

17. Testovacie ryby by sa mali vyberať z laboratórnej populácie, podľa možnosti z jednej zásoby, ktorá sa aklimatizovala najmenej dva týždne pred testom v podobných podmienkach, pokiaľ ide o kvalitu vody a osvetlenie, aké sa použijú v rámci testu. Je dôležité, aby veľkosť násady a chovná hustota (vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1) boli vhodné pre použitý testovací druh (pozri dodatok 2).

18. Po 48-hodinovej privykacej (adaptačnej) fáze sa zaznamená mortalita a uplatnia sa tieto kritériá:

— úmrtnosť za sedem dní prevyšuje 10 % populácie: celá násada sa vyradí,

— úmrtnosť je 5 – 10 % populácie: aklimatizovať ďalších sedem dní; ak je úmrtnosť počas ďalších siedmich dní vyššia ako 5 %, celá násada sa vyradí,

— úmrtnosť za sedem dní je nižšia ako 5 % populácie: násada sa akceptuje.

19. Ryby by nemali byť podrobené liečeniu chorôb počas aklimatizácie, v období pred expozíciou, ani počas expozície.

Obdobie pred expozíciou a výber rýb

20. Odporúča sa, aby sa živočíchy umiestnili do nádob podobných tým, ktoré sa použijú v rámci skutočného testu, na obdobie jedného týždňa pred expozíciou. Ryby by sa mali kŕmiť *ad libitum* počas celého obdobia uchovávania a počas fázy expozície. Fáza expozície sa začína s pohlavne dimorfnými dospelými rybami z laboratórnej zásoby reprodukčne zrelých živočíchov (napr. s jasne viditeľnými sekundárnymi pohlavnými znakmi v prípade čereble potočnej a medaky japonskej) vo fáze aktívneho neresenia.Tieto údaje slúžia iba ako všeobecné usmernenie (a nemali by sa brať do úvahy izolovane od pozorovania skutočného reprodukčného stavu danej násady rýb). Čereble potočné by mali byť približne v 20. (± 2) týždni života, za predpokladu, že počas celého života boli kultivované pri teplote 25 ± 2 °C. Medaky japonské by mali byť približne v 16. (± 2) týždni života, za predpokladu, že počas celého života boli kultivované pri teplote 25 ± 2 °C. Medaky japonské by mali byť približne v 16. (± 2) týždni života, za predpokladu, že počas celého života boli kultivované pri teplote 26 ± 2 °C.

KONCEPCIA TESTU

21. Používajú sa tri koncentrácie testovanej chemikálie, jedna kontrolná vzorka (voda), a ak je to potrebné, jedna kontrolná vzorka s rozpúšťadlom. Údaje je možné analyzovať s cieľom určiť štatisticky významné rozdiely medzi reakciami vo vzorkách s aplikovanou chemikáliou a v kontrolných vzorkách. Tieto analýzy poskytnú informáciu, či je potrebné ďalšie dlhodobejšie testovanie nepriaznivých účinkov (najmä na prežitie, rozvoj, rast a reprodukciu) skôr pre chemikáliu, než na účely hodnotenia rizika (24).

22. V prípade dánia pruhovaného a medaky japonskej sa v 21. deň testu z tiel samčekov a samičiek na každej úrovni aplikácie chemikálie (päť samčekov a päť samičiek v každom z dvoch replikátov) a v kontrolných skupinách odoberú vzorky na meranie vitelogenínu a sekundárnych pohlavných znakov, podľa potreby. V prípade čereble potočnej sa v 21. deň expozície z tiel samčekov a samičiek (dvaja samčekovia a štyri samičky v každom zo štyroch replikátov) a v kontrolných skupinách odoberú vzorky na stanovenie vitelogenínu a sekundárnych pohlavných znakov.

Výber testovacích koncentrácií

23. Na účely tohto testu by sa mala stanoviť najvyššia testovacia koncentrácia vo výške maximálnej tolerovanej koncentrácie (MTC), ktorá sa určí pomocou testu na zistenie rozsahu alebo z iných údajov o toxicite, alebo vo výške 10 mg/l, alebo na základe maximálnej rozpustnosti vo vode, podľa toho, ktorá hodnota je najnižšia. MTC sa vymedzuje ako najvyššia testovacia koncentrácia chemikálie, ktorá spôsobuje úmrtnosť nižšiu ako 10 %. Pri tomto prístupe sa predpokladá, že existujú empirické údaje o akútnej toxicite alebo iné údaje o toxicite, na základe ktorých je možné odhadnúť hodnotu MTC. Odhad hodnoty MTC môže byť nepresný a spravidla sa vyžaduje určitý odborný posudok.

24. Potrebné sú tri testovacie koncentrácie s konštantným faktorom rozstupu nepresahujúcim hodnotu 10 a kontrolná vzorka s riediacou vodou (v prípade potreby aj kontrolná vzorka s rozpúšťadlom). Odporúča sa celá škála faktorov rozstupu s hodnotami od 3,2 do 10.

POSTUP

Výber a váženie testovacích rýb

25. Je dôležité hneď na začiatku testu minimalizovať odchýlky v hmotnosti rýb. Vhodné rozsahy veľkosti rýb na použitie v rámci tohto testu pre rôzne druhy sú uvedené v dodatku 2. Pre celú násadu rýb použitých v rámci testu platí, že rozsah individuálnych hmotností samčekov a samičiek na začiatku testu by sa mal udržiavať podľa možnosti v rozsahu ± 20 % aritmetickej strednej hodnoty hmotnosti jedincov rovnakého pohlavia. Odporúča sa odvážiť aj čiastkovú vzorku zásoby rýb pred testom, aby bolo možné odhadnúť strednú hmotnosť.

Podmienky expozície

Trvanie

26. Test trvá 21 dní nasledujúcich po období pred expozíciou. Odporúčané obdobie pred expozíciou je jeden týždeň.

Kŕmenie

27. Ryby by sa mali kŕmiť *ad libitum* vhodnou potravou (dodatok 2) v dostatočnom množstve, aby sa udržiaval ich telesný stav. Treba dbať na to, aby sa predišlo rastu mikroorganizmov a zákalu vody. Ako všeobecné usmernenie platí, že denná dávka môže byť rozdelená do dvoch alebo troch rovnakých porcií podávaných vo viacerých kŕmeniach za deň, oddelene, najmenej s trojhodinovými prestávkami. Jedna väčšia porcia je prijateľná najmä počas víkendov. Ryby sa nekŕmia počas 12 hodín pred odberom vzoriek/pitvou.

28. Potrava pre ryby by sa mala hodnotiť z hľadiska prítomnosti kontaminantov, ako sú organochlórové pesticídy, polycyklické aromatické uhľovodíky, polychlórované bifenyly. Vylúčiť by sa mala potrava so zvýšenou úrovňou fytoestrogénov, ktorá by ovplyvnila reakciu pri teste na známe agonisty estrogénu (napr. 17-beta estradiol).

29. Nezožratá potrava a fekálny materiál by sa mali odstraňovať z testovacích nádob najmenej dvakrát týždenne, napríklad dôkladným vyčistením dna každej nádrže pomocou odsávania.

Svetlo a teplota

30. Fotoperióda a teplota vody by mali byť vhodné pre dané testovacie druhy (dodatok 2).

Frekvencia analytických stanovení a meraní

31. Pred začiatkom času expozície je potrebné zabezpečiť riadne fungovanie systému prísunu chemikálie. Pripraviť by sa mali všetky potrebné analytické metódy vrátane dostatočných vedomostí o chemickej stabilite v testovacom systéme. Počas testu sa koncentrácie testovanej chemikálie určujú v pravidelných časových intervaloch takto: prietoky riedidla a zásobného roztoku toxickej látky by sa mali kontrolovať podľa možnosti denne, ale minimálne dvakrát za týždeň, a nemali by sa počas celého testu meniť viac ako o 10 %. Odporúča sa merať skutočné koncentrácie testovanej chemikálie vo všetkých nádobách na začiatku testu a potom v týždenných intervaloch.

32. Odporúča sa, aby výsledky vychádzali z nameraných koncentrácií. V prípade, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ± 20 % nominálnej koncentrácie počas celého testu, výsledky môžu vychádzať buď z nominálnych, alebo z nameraných hodnôt.

33. Vzorky môže byť potrebné filtrovať (napr. pomocou filtra s veľkosťou pórov 0,45 µm) alebo odstreďovať. V prípade potreby je odstreďovanie odporúčaným postupom. Ak sa však testovaný materiál neabsorbuje na filtri, aj filtrácia je prijateľná.

34. Počas testu by sa najmenej raz za týždeň mala merať koncentrácia rozpusteného kyslíka, teplota a hodnota pH vo všetkých testovacích nádobách. Najmenej raz za týždeň by sa mala merať celková tvrdosť vody a alkalita v kontrolných nádobách a v jednej nádobe s najvyššou koncentráciou. Teplota by sa mala podľa možnosti monitorovať kontinuálne aspoň v jednej testovacej nádobe.

Pozorovania

35. V priebehu alebo na konci testu sa posudzujú viaceré všeobecné reakcie (napr. prežitie) a základné biologické reakcie (napr. úroveň vitelogenínu). Meranie a hodnotenie týchto parametrov a ich využitie sú opísané v ďalších bodoch.

Prežitie

36. Ryby by sa mali počas testovacieho obdobia denne kontrolovať, každý úhyn by sa mal zaznamenať a uhynutá ryba čo najskôr odstrániť. Mŕtve ryby by sa nemali nahrádzať ani v kontrolných nádobách, ani v nádobách s aplikovanou chemikáliou. Pohlavie rýb, ktoré uhynuli počas testu, by sa malo určiť makroskopickým hodnotením gonád.

Správanie a vzhľad

37. Akékoľvek abnormálne správanie (v porovnaní s kontrolnými vzorkami) by sa malo zaznamenať. Môže ísť o príznaky všeobecnej toxicity vrátane hyperventilácie, nekoordinovaného plávania, straty rovnováhy a atypickej nehybnosti alebo kŕmenia. Okrem toho by sa mali zaznamenať aj vonkajšie abnormality (ako napríklad krvácanie, strata farby). Takéto príznaky toxicity by sa mali starostlivo zvážiť pri interpretácii údajov, lebo môžu naznačovať existenciu koncentrácií, pri ktorých biomarkery endokrinného pôsobenia nie sú spoľahlivé. Takéto pozorovania správania môžu poskytovať aj užitočné kvalitatívne informácie na vypracovanie potenciálnych budúcich požiadaviek na vykonávanie testov s rybami. Napríklad v prípade normálnych samčekov a maskulinizovaných samičiek čereble potočnej, vystavených androgénnemu pôsobeniu, bola pozorovaná teritoriálna agresivita. V prípade dánia pruhovaného sa po vystavení estrogénnemu alebo anti-androgénnemu pôsobeniu znižuje alebo spomaľuje charakteristická aktivita pri párení a neresení.

38. Keďže niektoré aspekty vzhľadu (predovšetkým farba) sa môžu rýchlo zmeniť pri manipulácii, je dôležité, aby sa kvalitatívne pozorovania vykonávali pred odstránením živočíchov z testovacieho systému. Doterajšie skúsenosti s druhom čereble potočnej naznačujú, že niektoré chemikálie s účinkom na endokrinný systém môžu najskôr vyvolať zmeny týchto vonkajších znakov: farba tela (svetlá alebo tmavá), vzorované sfarbenie (prítomnosť zvislých pruhov) a tvar tela (hlavová a prsná oblasť). Pozorovania fyzického vzhľadu rýb by sa preto mali vykonávať v priebehu celého testu a na záver štúdie.

Humánne usmrcovanie rýb

39. V 21. deň, t. j. po ukončení expozície, by sa ryby mali usmrtiť primeraným množstvom trikaínu [trikaín metán sulfonát, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2)], 100 – 500 mg/l, tlmeného pridaním 300 mg/l $NaHCO_3$ (bikarbonát sodný, CAS 144-55-8) na zníženie podráždenia slizníc. Potom sa odoberú vzorky krvi alebo tkaniva na stanovenie vitelogenínu, ako je vysvetlené v príslušnej časti.

Pozorovanie sekundárnych pohlavných znakov

40. Niektoré chemikálie s účinkom na endokrinný systém môžu vyvolávať zmeny špecializovaných sekundárnych pohlavných znakov (počet tuberkulov pri samčekoch čereble potočnej, papilárnych procesov pri samčekoch medaky). Najmä chemikálie s určitými mechanizmami pôsobenia môžu vyvolávať abnormálny výskyt sekundárnych pohlavných znakov pri živočíchoch opačného pohlavia, napríklad agonisty androgénových receptorov, ako sú trenbolón, metyltestosterón a dihydrotestosterón, môžu spôsobovať vyvinutie výrazných tuberkulov pri samičkách čereble potočnej alebo papilárnych procesov pri samičkách medaky (11), (20), (21). Uvádza sa tiež, že agonisty estrogénových receptorov môžu znížiť počet tuberkulov a veľkosť záhlavnej časti chrbta pri dospelých samčekoch (25), (26). Takéto celkové morfologické pozorovania môžu poskytovať užitočné kvalitatívne a kvantitatívne informácie na vypracovanie potenciálnych budúcich požiadaviek na vykonávanie testov s rybami. Počet a veľkosť tuberkulov pri čerebli potočnej a papilárnych procesov pri medake je možné kvantifikovať priamo alebo praktickejšie na konzervovaných exemplároch. V dodatkoch 5A a 5B sú uvedené odporúčané postupy na hodnotenie sekundárnych pohlavných znakov čereble potočnej, resp. medaky.

Vitelogenín (VTG)

41. Krv sa odoberá z chvostovej tepny/žily pomocou heparinizovanej mikrohematokritovej kapilárnej kanyly, alebo alternatívne srdcovou punkciou pomocou striekačky. V závislosti od veľkosti rýb sa objem krvi, ktorú je možné odobrať, vo všeobecnosti pohybuje v rozmedzí 5 – 60 µl na jeden exemplár čereble potočnej a 5 – 15 µl na jeden exemplár dánia pruhovaného. Plazma sa oddelí od krvi odstredením a uchová sa s inhibítorom proteázy pri teplote – 80 °C, pokým nebude analyzovaná na prítomnosť vitelogenínu. Alternatívne sa ako zdroj tkaniva na stanovenie vitelogenínu použije pečeň v prípade medaky a homogenát z hlavy/chvosta v prípade dánia pruhovaného (dodatok 6). Meranie vitelogenínu by malo byť založené na validovanej homologickej metóde ELISA, s použitím homologického štandardu vitelogenínu a homologických protilátok. Odporúča sa použiť metódu, pomocou ktorej je možné zistiť množstvo vitelogenínu na úrovni niekoľkých ng/ml plazmy (alebo ng/mg tkaniva), čo je úroveň pozadia v tele samčekov rýb bez aplikovanej chemikálie.

42. Kontrola kvality analýzy vitelogenínu sa vykoná s použitím štandardov, slepých vzoriek a aspoň dvojitej analýzy. Pre každú metódu ELISA by sa mal pri určovaní minimálneho faktora riedenia vzorky vykonať test na matricový efekt (efekt zriedenia vzorky). Každá platnička ELISA používaná v rámci testov na zistenie vitelogenínu by mala obsahovať tieto vzorky na kontrolu kvality: najmenej šesť kalibračných štandardov zahŕňajúcich rozsah očakávaných koncentrácií vitelogenínu a najmenej jednu nešpecifickú viazanú testovaciu slepú vzorku (analyzuje sa duplicitne). Absorbancia týchto slepých vzoriek by mala byť nižšia ako 5 % maximálnej absorbancie kalibračného štandardu. Analyzovať sa budú najmenej dve alikvotné časti (paralelné) každého zriedenia vzorky. Paralelné vzorky, ktoré sa líšia o viac ako 20 %, by sa mali opätovne analyzovať.

43. Korelačný koeficient (R^2) pre kalibračné krivky by mal byť väčší ako 0,99. Vysoká korelácia však nie je dostatočná na to, aby sa zaručilo primerané predvídanie koncentrácie vo všetkých rozsahoch. Okrem dostatočne vysokej korelácie pre kalibračnú krivku by koncentrácia každého štandardu, ktorá sa vypočíta z kalibračnej krivky, mala ležať v rozsahu 70 – 120 % nominálnej koncentrácie. Ak sa nominálne koncentrácie odkláňajú od kalibračnej regresnej priamky (napr. pri nižších koncentráciách), môže byť nevyhnutné rozdeliť kalibračnú krivku na nízky a vysoký rozsah, alebo použiť nelineárny model, ktorý primerane zodpovedá údajom o absorbancii. Ak sa krivka rozdelí, obidve jej časti by mali mať $R^2 > 0,99$.

44. Detekčný limit (LOD) je vymedzený ako koncentrácia najnižšieho analytického štandardu a limit kvantifikácie (LOQ) je vymedzený ako súčin koncentrácie najnižšieho analytického štandardu a najnižšieho faktora riedenia.

45. Každý deň, keď sa vykonávajú testy na zistenie vitelogenínu, sa budú analyzovať obohatené vzorky s použitím referenčnej látky-štandard (dodatok 7). Spolu s výsledkami z každého súboru testov vykonaných v tento deň sa uvádza pomer očakávanej koncentrácie a nameranej koncentrácie.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Vyhodnocovanie reakcií biomarkerov pomocou analýzy rozptylu (ANOVA)

46. Na zistenie potenciálneho endokrinného pôsobenia chemikálie sa porovnávajú reakcie v skupinách s aplikovanou chemikáliou a reakcie v kontrolných skupinách pomocou analýzy rozptylu (ANOVA). Ak sa použije kontrolná vzorka s rozpúšťadlom, mali by sa pre každý parameter vykonať vhodné štatistické testy na porovnanie kontrolných vzoriek s riediacou vodou a kontrolných vzoriek s rozpúšťadlom. Usmernenia k spôsobu použitia údajov z kontrolných vzoriek s riediacou vodou a kontrolných vzoriek s rozpúšťadlom v následnej štatistickej analýze je možné nájsť v dokumente OECD 2006c (27). Všetky údaje o biologických reakciách by sa mali analyzovať a uvádzať osobitne podľa pohlavia. Ak sa nesplnia požadované predpoklady parametrických metód – iné ako normálne rozdelenie (napr. Shapiro-Wilkov test) alebo heterogénny rozptyl (Barlettov test), je potrebné zvážiť transformovanie údajov pred vykonaním analýzy ANOVA tak, aby sa dosiahli homogénne rozptyly, alebo vykonanie váženej ANOVA. V prípade nemonotónnej závislosti reakcie od dávky sa môže použiť Dunnettov test (parametrický) na viacnásobné párové porovnávanie alebo Mannov-Whitneyho test s Bonferroniho úpravou (neparametrický). Ak je závislosť reakcie od dávky približne monotónna, môžu sa použiť iné štatistické testy (napr. Jonckheereho-Terpstrov test alebo Williamsov test). V dodatku 8 je uvedený štatistický diagram, ktorý má pomôcť pri rozhodovaní o najvhodnejšom štatistickom teste na použitie. Doplnkové informácie je možné získať aj z dokumentu OECD o súčasných prístupoch v štatistickej analýze údajov o ekotoxicite (27).

Podávanie správ o výsledkoch testu

47. Údaje štúdie by mali zahŕňať:

Testovacie zariadenie:

— zodpovední pracovníci a ich úlohy v rámci štúdie,

— každé laboratórium preukáže odbornosť v používaní škály reprezentatívnych chemikálií.

Testovaná chemikália:

— charakteristika testovanej chemikálie,

— fyzikálny charakter a dôležité fyzikálno-chemické vlastnosti,

— metóda a frekvencia prípravy testovacích koncentrácií,

— informácie o stabilite a biodegradovateľnosti.

Rozpúšťadlo:

— charakteristika rozpúšťadla (povaha, použitá koncentrácia),

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla (ak je iné ako voda).

Testovacie živočíchy:

— druh a kmeň,

— dodávateľ a konkrétne zariadenie dodávateľa,

— vek rýb na začiatku testu a stav reprodukcie/neresenia,

— údaje o postupe aklimatizácie živočíchov,

— telesná hmotnosť rýb na začiatku expozície (z podvzorky populácie rýb).

Podmienky testu:

— použitý postup testovania (druh testu, stupeň zaťaženia, chovná hustota atď.),

— metóda prípravy zásobných roztokov a prietok,

— nominálne testovacie koncentrácie, týždenne merané koncentrácie testovacích roztokov a použitá analytická metóda, stredné namerané hodnoty a štandardné odchýlky v testovacích nádobách a dôkaz o tom, že merania zodpovedajú koncentráciám testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,

— charakteristiky riediacej vody (vrátane pH, tvrdosti, alkality, teploty, koncentrácie rozpusteného kyslíka, úrovne reziduálneho chlóru, celkového organického uhlíka, suspendovaných tuhých látok a výsledkov akýchkoľvek iných vykonaných meraní),

— kvalita vody v testovacích nádobách: pH, tvrdosť, teplota a koncentrácia rozpusteného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení [napr. druh potravy, zdroj, dávkované množstvo a frekvencia a analýza príslušných kontaminantov (napr. polychlórované bifenyly, polycyklické aromatické uhľovodíky a organochlórové pesticídy), ak je k dispozícii].

Výsledky

— dôkaz, že kontrolné vzorky splnili kritériá prijateľnosti testu,

— údaje o úmrtnosti vyskytujúcej sa pri každej z testovacích koncentrácií a v kontrolnej vzorke,

— používané štatistické analytické techniky, spracovanie údajov a odôvodnenie použitia daných techník,

— údaje o biologických pozorovaniach celkovej morfológie vrátane sekundárnych pohlavných znakov a vitelogenínu,

— výsledky analýz údajov, najlepšie v tabuľkovej a grafickej forme,

— výskyt akýchkoľvek neobvyklých reakcií rýb a akýchkoľvek viditeľných účinkov vyvolaných testovanou chemikáliou.

USMERNENIE PRE INTERPRETÁCIU A AKCEPTÁCIU VÝSLEDKOV TESTU

48. Táto časť obsahuje niekoľko aspektov, ktoré treba brať do úvahy pri interpretácii výsledkov testu pre jednotlivé merané parametre. Výsledky by sa mali interpretovať opatrne, ak sa zdá, že testovaná chemikália má zjavné toxické účinky alebo ovplyvňuje celkový stav testovacieho živočícha.

49. S cieľom umožniť zmysluplnú interpretáciu údajov je potrebné pri stanovení rozsahu testovacích koncentrácií dbať na to, aby sa neprekročila maximálna tolerovaná koncentrácia. Je dôležité mať najmenej jednu vzorku s aplikovanou chemikáliou, v ktorej nie sú žiadne príznaky toxických účinkov. Príznaky choroby a príznaky toxických účinkov by sa mali dôkladne vyhodnotiť a zaznamenať. Je napríklad možné, že produkciu vitelogenínu v telách samičiek môže ovplyvňovať aj všeobecná toxicita a neendokrinné toxické mechanizmy pôsobenia, napríklad hepatotoxicita. Interpretáciu účinkov však môžu podporiť iné množstvá aplikovanej chemikálie, ktoré nie je možné si pomýliť so systémovou toxicitou.

50. Existuje niekoľko aspektov, ktoré treba brať do úvahy pri akceptácii výsledkov testu. Ako usmernenie platí, že úrovne vitelogenínu v kontrolných skupinách samčekov a samičiek by mali byť odlišné a líšiť by sa mali približne o tri rádové hodnoty v prípade čereble potočnej a dánia pruhovaného a približne o jeden rád v prípade medaky. Príklady rozsahu hodnôt, ktoré sa vyskytli v kontrolných skupinách a v skupinách s aplikovanou chemikáliou, sú k dispozícii vo validačných správach (1), (2), (3), (4). Vysoké hodnoty vitelogenínu pri samčekoch v kontrolných skupinách by mohli ohroziť citlivosť testu a jeho schopnosť odhaliť slabé agonisty estrogénu. Nízke hodnoty vitelogenínu pri samičkách v kontrolných skupinách by mohli ohroziť citlivosť testu a jeho schopnosť odhaliť inhibítory aromatázy a antagonisty estrogénu. Na vypracovanie tohto usmernenia sa použili validačné štúdie.

51. Ak laboratórium predtým nevykonávalo tento test alebo nastali podstatné zmeny (napr. zmena kmeňa rýb alebo dodávateľa), je vhodné realizovať štúdiu technickej spôsobilosti. Odporúča sa použitie chemikálií, ktoré zahŕňajú rôzne mechanizmy pôsobenia alebo vplyvu na viaceré parametre testu. V praxi sa každému laboratóriu odporúča, aby si budovalo svoju vlastnú databázu historických kontrolných údajov pre samčekov a samičky a aby používalo pozitívnu kontrolnú chemikáliu na estrogénne pôsobenie (napr. 17β-estradiol, 100 ng/l, alebo známe slabé agonisty), ktoré vedie k zvýšeniu množstva vitelogenínu v telách samčekov rýb, pozitívnu kontrolnú chemikáliu na inhibíciu aromatázy (napr. fadrozol alebo prochloraz, 300 µg/l), ktorá vedie k zníženiu množstva vitelogenínu v telách samičiek rýb, a pozitívnu kontrolnú chemikáliu na androgénne pôsobenie (napr. 17β-trenbolón, 5 µg/l), ktoré vedie k vzniku sekundárnych pohlavných znakov pri samičkách čereble potočnej a medaky. Všetky tieto údaje je možné porovnať s dostupnými údajmi z validačných štúdií (1), (2), (3), aby sa zabezpečila odbornosť laboratória.

52. Vo všeobecnosti by sa malo meranie vitelogenínu považovať za pozitívne, ak existuje štatisticky významné zvýšenie množstva vitelogenínu v telách samčekov ($p < 0,05$) alebo štatisticky významný pokles v telách samičiek ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou, aspoň pri najvyššej testovacej dávke, a ak sa nevyskytnú príznaky všeobecnej toxicity. Pozitívny výsledok ďalej podporí preukázanie biologicky hodnoverného vzťahu medzi dávkou a reakciou. Ako už bolo uvedené, pokles množstva vitelogenínu nemusí mať výlučne endokrinný pôvod. Pozitívny výsledok by sa však mal vo všeobecnosti interpretovať ako dôkaz endokrinného pôsobenia *in vivo* a mal by spravidla viesť k opatreniam na ďalšie objasnenie.

LITERATÚRA

1. OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.

2. OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.

3. OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.

4. Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

5. US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. s. 104.

6. OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.

7. Sumpter a Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173 – 8 Review.

8. Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277 – 91.

9. Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343 – 52.

10. Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences;67(1):121 – 30.

11. Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11 – 21.

12. Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113 – 25.

13. Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brusel, Belgicko.

14. Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217 – 232.

15. Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119 – 131.

16. Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17ß-estradiol and 17ß-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531 – 539.

17. Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699 – 1708.

18. Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). Jpn J Environ Toxicol 4:87 – 98.

19. Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M a Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301 – 308.

20. Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350 – 60.

21. Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774 – 81.

22. OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paríž.

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 17β-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 a G. T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478 – 488.

27. OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO (2006)18.

28. OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22.

Dodatok 1

Skratky a vymedzenie pojmov

Chemikália: látka alebo zmes.

CV: variačný koeficient.

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie.

Stupeň zaťaženia: čerstvá hmotnosť rýb na objem vody.

Chovná hustota: počet rýb na objem vody.

Vitelogenín (VTG): fosfolipoglykoproteín, slúžiaci ako prekurzor proteínov vaječného žĺtka, ktorý sa normálne vyskytuje v telách pohlavne aktívnych samičiek všetkých vajcorodých druhov.

Os HHG (HPG): os hypothalamus – hypofýza – gonády (hypothalamic-pituitary-gonadal).

MTC (maximum tolerated concentration): maximálna tolerovaná koncentrácia, ktorá predstavuje približne 10 % hodnoty LC_{50}.

Testovaná chemikália: je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Dodatok 2

Experimentálne podmienky skríningového testu na endokrinnom systéme rýb

1. Odporúčaný druh	**Čerebľa potočná** (*Pimephales promelas*)	**Medaka** (*Oryzias latipes*)	**Dánio pruhované** (*Danio rerio*)
2. Druh testu	prietokový	prietokový	prietokový
3. Teplota vody	25 ± 2°C	25 ± 2°C	26 ± 2°C
4. Kvalita osvetlenia	Žiarivky (široké spektrum)	Žiarivky (široké spektrum)	Žiarivky (široké spektrum)
5. Intenzita svetla	10 – 20 µE/m²/s, 540 – 1 000 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)	10 – 20 µE/m²/s, 540 – 1 000 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)	10 – 20 µE/m²/s, 540 – 1 000 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)
6. Fotoperióda (možné sú prechody svitania/súmraku, ale nepovažujú sa za nutné)	16 hodín svetla a 8 hodín tmy	12 – 16 hodín svetla a 12 – 8 hodín tmy	12 – 16 hodín svetla a 12 – 8 hodín tmy
7. Stupeň zaťaženia	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Veľkosť skúšobnej komory	10 l (minimálne)	2 l (minimálne)	5 l (minimálne)
9. Objem testovacieho roztoku	8 l (minimálne)	1,5 l (minimálne)	4 l (minimálne)
10. Výmeny objemu testovacích roztokov	minimálne 6 denne	minimálne 5 denne	minimálne 5 denne
11. Vek testovacích organizmov	pozri bod 20	pozri bod 20	pozri bod 20
12. Približná mokrá hmotnosť dospelých rýb (g)	samičky: 1,5 ± 20 % samčekovia: 2,5 ± 20 %	samičky: 0,35 ± 20 % samčekovia: 0,35 ± 20 %	samičky: 0,65 ± 20 % samčekovia: 0,4 ± 20 %
13. Počet rýb v každej testovacej nádobe	6 (2 samčekovia a 4 samičky)	10 (5 samčekov a 5 samičiek)	10 (5 samčekov a 5 samičiek)
14. Počet vzoriek s aplikovanou chemikáliou	= 3 (plus primerané kontrolné vzorky)	= 3 (plus primerané kontrolné vzorky)	= 3 (plus primerané kontrolné vzorky)
15. Počet nádob na každú aplikáciu chemikálie	minimálne 4	minimálne 2	minimálne 2
16. Počet rýb na každú testovanú koncentráciu	16 dospelých samičiek a 8 samčekov (4 samičky a 2 samčekovia v každej replikačnej nádobe)	10 dospelých samičiek a 10 samčekov (5 samičiek a 5 samčekov v každej replikačnej nádobe)	10 dospelých samičiek a 10 samčekov (5 samičiek a 5 samčekov v každej replikačnej nádobe)

17. Kŕmny režim	živé alebo mrazené dospelé jedince alebo larvy žiabronôžky soľnej, dva- alebo trikrát denne (*ad libitum*), komerčne dostupná potrava, alebo kombinácia uvedeného	larvy žiabronôžky soľnej, dva- alebo trikrát denne (*ad libitum*), komerčne dostupná potrava, alebo kombinácia uvedeného	larvy žiabronôžky soľnej, dva- alebo trikrát denne (*ad libitum*), komerčne dostupná potrava, alebo kombinácia uvedeného
18. Prevzdušňovanie	žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % hodnoty saturácie vzduchom	žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % hodnoty saturácie vzduchom	žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % hodnoty saturácie vzduchom
19. Riediaca voda	s čistým povrchom, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu	s čistým povrchom, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu	s čistým povrchom, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu
20. Obdobie pred expozíciou	odporúča sa 7 dní	odporúča sa 7 dní	odporúča sa 7 dní
21. Trvanie expozície chemikálii	21 dní	21 dní	21 dní
22. Biologické parametre	prežitie správanie sekundárne pohlavné znaky vitelogenín	prežitie správanie sekundárne pohlavné znaky vitelogenín	prežitie správanie vitelogenín
23. Prijateľnosť testu	rozpustený kyslík > 60 % saturácie; stredná teplota 25 °C ± 2 °C; prežitie rýb v kontrolných vzorkách 90 %; merané testovacie koncentrácie v rozsahu 20 % strednej meranej hodnoty pre každú úroveň aplikácie chemikálie	rozpustený kyslík > 60 % saturácie; stredná teplota 24 °C ± 2 °C; prežitie rýb v kontrolných vzorkách 90 %; merané testovacie koncentrácie v rozsahu 20 % strednej meranej hodnoty pre každú úroveň aplikácie chemikálie	rozpustený kyslík > 60 % saturácie; stredná teplota 26 ° C ± 2 °C; prežitie rýb v kontrolných vzorkách 90 %; merané testovacie koncentrácie v rozsahu 20 % stredných meraných hodnôt pre každú úroveň aplikácie chemikálie

Dodatok 3

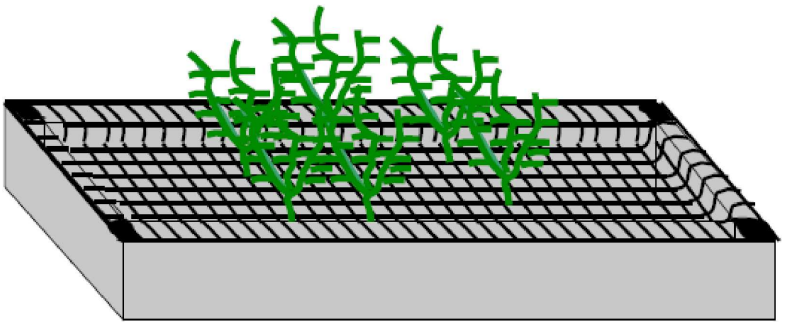
Niektoré chemické vlastnosti prijateľnej riediacej vody

Zložka	Koncentrácie
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy a polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

Dodatok 4A

Substrát na neresenie pre dánio pruhované

Nádoba na neresenie: celosklená nádoba s rozmermi napríklad 22 × 15 × 5,5 cm (dĺžka × šírka × výška) pokrytá odnímateľnou drôtenou mriežkou z nehrdzavejúcej ocele (so šírkou otvorov 2 mm). Mriežka by mala pokrývať otvor nádoby v rovine položenej nižšie, ako je okraj nádoby.



Na mriežku by sa mal upevniť substrát na neresenie. Rybám by mal poskytovať štruktúru, do ktorej môžu preniknúť. Vhodné sú napríklad umelé akváriové rastliny vyrobené zo zeleného plastového materiálu (poznámka: je potrebné zobrať do úvahy možnú adsorpciu testovanej chemikálie na plastový materiál). Plastový materiál by sa mal dostatočne dlho lúhovať v dostatočnom objeme teplej vody, aby sa zabezpečilo, že do vody použitej na testovanie sa neprenesú žiadne chemikálie. V prípade použitia sklených materiálov by sa malo zabezpečiť, aby sa ryby pri intenzívnom pohybe nezranili ani neochromili.

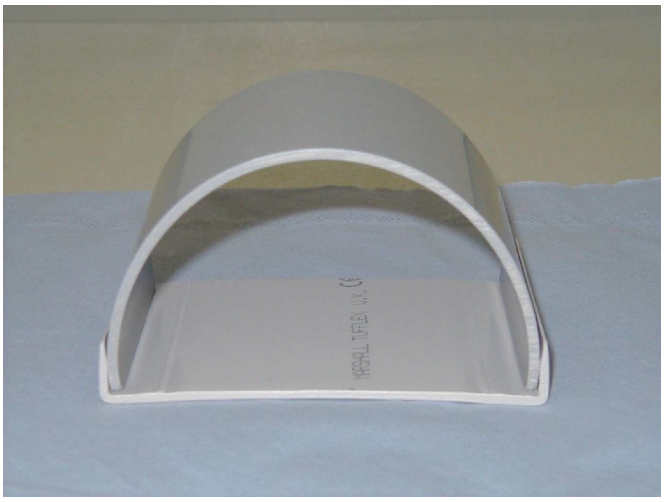
Vzdialenosť medzi nádobou a sklenými stenami by mala byť najmenej 3 cm, aby sa zabezpečilo, že neresenie sa nevykonáva mimo nádoby. Vajíčka vzniknuté neresením v nádobe prepadávajú cez mriežku a môžu byť odobraté ako vzorky 45 – 60 minút po začiatku osvetlenia. Priesvitné vajíčka sú nepriľnavé a ľahko sa počítajú pomocou transverzálneho svetla. Pri použití piatich samičiek na nádobu sa denný počet vajíčok do 20 môže považovať za nízky, od 20 do 100 za stredný a nad 100 za vysoký. Nádoba na neresenie by sa mala vybrať, vajíčka zozbierať a nádobu na neresenie vložiť späť do testovacej nádoby, buď čo najneskôr večer, alebo veľmi skoro ráno. Čas, ktorý uplynie do opätovného vloženia, by nemal presiahnuť jednu hodinu, lebo inak stopa substrátu na neresenie môže vyvolať individuálne párenie a neresenie v nezvyčajnom čase. Ak si situácia vyžaduje neskoršie vloženie nádoby na neresenie, malo by sa to urobiť najmenej 9 hodín po začiatku osvetlenia. V tomto pokročilom dennom čase sa už neresenie nevyvoláva.

Dodatok 4B

Substrát na neresenie pre čerebľu potočnú

Do každej skúšobnej komory sa umiestnia dva alebo tri kombinované plastové/keramické/sklené alebo nerezové oblúkové kryty s podložkami na neresenie (napr. 80 mm dlhý sivý polkruhový žľab uložený na podložke so zvýšeným okrajom a s dĺžkou 130 mm) (pozri obrázok). Riadne vyzreté kryty z PVC alebo keramiky sa ukázali ako vhodné miesto pre substrát na neresenie (Thorpe *et al*, 2007).

Odporúča sa kryty obrúsiť, aby sa zvýšila ich adhézia. Podložka by mala byť prekrytá sieťkou tak, aby sa zabránilo rybám v prístupe k padajúcim vajíčkam, pokiaľ nebola preukázaná účinná priľnavosť k substrátu na neresenie.



Dno je konštruované tak, aby obsahovalo všetky vajíčka, ktoré nepriľnú k povrchu krytu a spadnú na dno nádoby (alebo vajíčka, ktoré sa uložia priamo na plochú plastovú spodnú časť). Všetky substráty na neresenie by sa mali pred použitím minimálne 12 hodín lúhovať v riediacej vode.

LITERATÚRA

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.

Dodatok 5A

Posúdenie sekundárnych pohlavných znakov čereble potočnej na zistenie určitých chemikálií s účinkom na endokrinný systém

Prehľad

Medzi potenciálne dôležité znaky fyzického vzhľadu dospelých jedincov čereble potočnej pri testovaní endokrinných disruptorov patrí farba tela (t. j. svetlá/tmavá), vzorované sfarbenie (t. j. prítomnosť alebo neprítomnosť zvislých pruhov), tvar tela (t. j. tvar hlavovej a prsnej oblasti, brušná distenzia) a špecializované sekundárne pohlavné znaky (t. j. počet a veľkosť tuberkulov, veľkosť záhlavnej časti chrbta a kladielka).

Tuberkuly sa nachádzajú na hlave (záhlavná časť chrbta) reprodukčne aktívnych samčekov čereble potočnej a ich usporiadanie je obvykle dvojstranne symetrické (Jensen *et al.*, 2001). Kontrolné vzorky samičiek a mladých samčekov a samičiek nevykazujú vznik žiadnych tuberkulov (Jensen *et al.*, 2001). Až osem jednotlivých tuberkulov sa môže nachádzať okolo očí a medzi nozdrami samčekov. Najväčší počet tuberkulov s najväčšou veľkosťou je umiestnený v dvoch rovnobežných líniách bezprostredne pod nozdrami a nad ústami. prípade mnohých rýb sa skupiny tuberkulov vyskytujú pod dolnou čeľusťou, pričom najbližšie k ústam sa spravidla vyskytujú v pároch, zatiaľ čo bližšie k brušnej časti vznikajú ako skupiny až štyroch tuberkulov. Celkový počet tuberkulov je zriedkavo vyšší ako 30 (rozsah 18 – 28; Jensen *et al.* 2001). Prevládajú (z hľadiska počtu) tuberkuly, ktoré tvoria samostatnú, relatívne okrúhlu štruktúru s výškou približne rovnou polomeru. Väčšina reprodukčne aktívnych samčekov má tiež prinajmenšom niekoľko tuberkulov, ktoré sú zväčšené a výrazné natoľko, že sú nerozoznateľné ako jednotlivé štruktúry.

Niektoré druhy chemikálií narušujúcich endokrinný systém môžu vyvolávať abnormálny výskyt určitých sekundárnych pohlavných znakov pri živočíchoch opačného pohlavia. Napríklad agonisty androgénových receptorov, ako sú 17β-metyltestosterón alebo 17β-trenbolón, môžu spôsobovať vyvinutie tuberkulov pri samičkách čereble potočnej (Smith, 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), zatiaľ čo agonisty estrogénových receptorov môžu znížiť počet alebo veľkosť tuberkulov pri samčekoch (Miles – Richardson *et al.*, 1999; Harries *et al.* 2000).

V ďalšej časti sa uvádza opis charakteristiky tuberkulov čereble potočnej na základe postupov používaných Agentúrou na ochranu životného prostredia Spojených štátov amerických v meste Duluth v štáte Minnesota. Špecifické produkty a/alebo zariadenia sa môžu nahradiť porovnateľnými materiálmi, ktoré sú k dispozícii.

Prehliadanie sa najlepšie vykonáva pomocou osvetlenej lupy alebo trikrát osvetleného stereoskopického mikroskopu. Ryba sa prehliada zo strany chrbta, natočená prednou časťou dopredu (hlavou k prehliadačovi).

a) Ryba sa uloží do malej Petriho misky (napr. s priemerom 100 mm), prednou časť dopredu a brušnou nadol. Hľadáčik sa zameria tak, aby bola možná identifikácia tuberkulov. Ryba sa jemne a pomaly otáča zo strany na stranu a identifikujú sa oblasti tuberkulov. Tuberkuly sa spočítajú a zaznamenajú.

b) Ryba sa v Petriho miske uloží chrbtovou časťou nadol, prednou dopredu, a vykoná sa prehliadka povrchu brušnej časti hlavy.

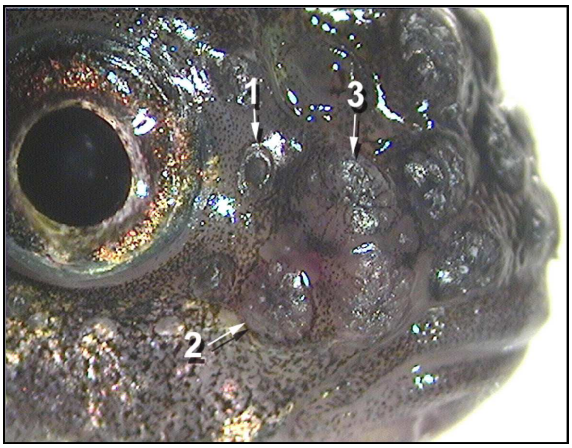
c) Pozorovania každej ryby by sa mali ukončiť do dvoch minút.

Počítanie a klasifikácia tuberkulov

Určených bolo šesť osobitných oblastí hodnotenia prítomnosti a vývoja tuberkulov pri dospelých jedincoch čereble potočnej. Vypracoval sa vzor, ako mapovať umiestnenie a množstvo prítomných tuberkulov (pozri koniec tohto dodatku). Počet tuberkulov sa zaznamenáva a ich veľkosť môže byť pre každý organizmus kvantitatívne klasifikovaná ako: 0 – neprítomný, 1 – prítomný, 2 – zväčšený a 3 – výrazný (obrázok 1).

Kategória 0 – neprítomný nijaký tuberkul. Kategória 1 – prítomný, identifikovaný akýkoľvek jednotlivý tuberkul, ktorého výška sa približne rovná jeho polomeru (priemeru).Kategória 2 – zväčšený, identifikovaný na základe tkaniva, ktoré vzhľadom pripomína hviezdičku, zvyčajne s veľkou radiálnou základňou s drážkami alebo so žliabkami vychádzajúcimi zo stredu. Vrchná časť tuberkula je často viac vrúbkovaná, ale niekedy môže byť čiastočne zaoblená. Kategória 3 – výrazný, zvyčajne pomerne veľký a zaoblený, s menej rozlíšenou štruktúrou. Tieto tuberkuly niekedy spoločne vytvárajú jednotnú masu v jednej oblasti alebo v kombinácii oblastí (B, C a D, ako je opísané v ďalšej časti). Sfarbenie a tvar sú podobné ako v rámci klasifikácie 2, ale niekedy sú dosť málo rozlíšiteľné. Použitie tohto systému klasifikácie vo všeobecnosti povedie k celkovej hodnote < 50 pri bežnom samčekovi z kontrolnej vzorky, s počtom tuberkulov 18 – 20 (Jensen *et al.*, 2001).

Obrázok 1



Skutočný počet tuberkulov na tele niektorých rýb môže byť väčší ako počet políčok v šablóne (dodatok A) pre určitú klasifikovanú oblasť. V takom prípade je možné vyznačiť ďalšie čísla klasifikácie vpravo alebo vľavo od príslušného políčka. Zobrazenie šablóny preto nemusí byť symetrické. Ďalšou technikou mapovania tuberkulov, ktoré sú spojené v pároch alebo vertikálne pozdĺž horizontálnej roviny úst, by mohlo byť dvojité značenie dvoch bodov klasifikácie tuberkulov v jednom políčku.

Mapovacie oblasti:

A – tuberkuly nachádzajúce sa okolo očí. Mapujú sa od chrbtovej časti po brušnú časť okolo predného okraja očí. Na telách zrelých samčekov v kontrolných vzorkách ich je spravidla väčší počet, na telách samičiek v kontrolných vzorkách nie sú prítomné, na telách samičiek vystavených pôsobeniu androgénov sa vo všeobecnosti nachádzajú dva (jeden pri každom oku) alebo jeden osamotený.

B – tuberkuly nachádzajúce sa medzi nozdrami (otvormi zmyslových kanálov). Na telách zrelých samčekov v kontrolných vzorkách sa spravidla vyskytujú v pároch, na vyšších úrovniach vývoja (2 – zväčšené alebo 3 – výrazné). Na telách samičiek v kontrolných vzorkách nie sú prítomné, pričom určitý výskyt a vývoj sa zaznamenal na telách samičiek vystavených pôsobeniu androgénov.

C – tuberkuly nachádzajúce sa bezprostredne pred nozdrami, rovnobežne s ústami. Na telách zrelých samčekov v kontrolných vzorkách sú vo všeobecnosti zväčšené alebo výrazné. Na telách menej vyvinutých samčekov alebo samičiek vystavených pôsobeniu androgénov sú prítomné alebo zväčšené.

D – tuberkuly nachádzajúce sa rovnobežne pozdĺž línie úst. Na telách zrelých samčekov v kontrolných vzorkách sa vyvíjajú všeobecne podľa klasifikácie. Na telách samičiek v kontrolných vzorkách nie sú prítomné, ale na telách samičiek vystavených pôsobeniu androgénov sú prítomné.

E – tuberkuly nachádzajúce sa na dolnej čeľusti, v blízkosti úst, zvyčajne malé a spravidla v pároch. Výskyt je rôzny v prípade samčekov v kontrolných vzorkách alebo vo vzorkách s aplikovanou chemikáliou a v prípade samičiek vo vzorkách s aplikovanou chemikáliou.

F – tuberkuly nachádzajúce sa v brušnej časti priľahlej k oblasti E. Spravidla sú malé a vyskytujú sa v pároch. Prítomné sú na telách samčekov v kontrolných vzorkách a na telách samičiek vystavených pôsobeniu androgénov.

ODKAZY

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.

Šablóna pre tuberkuly

Identifikácia _____

Dátum _____

Celková hodnota _____

Číselná klasifikácia

1 – prítomný

2 – zväčšený

3 – výrazný

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

Dodatok 5B

Posúdenie sekundárnych pohlavných znakov medaky pri zisťovaní určitých chemikálií s účinkom na endokrinný systém

Nasleduje opis merania papilárnych procesov (*), ktoré sú sekundárnymi pohlavnými znakmi medaky (*Oryzias latipes*).

(*) Papilárne procesy sa spravidla vyskytujú len pri dospelých samčekoch a nachádzajú sa na lúčoch análnej plutvy od druhého po siedmy alebo ôsmy, počítajúc od zadného konca plutvy (obrázok 1 a 2). Procesy sa však len zriedka vyskytujú na prvom lúči od zadného konca análnej plutvy. Tento štandardný operačný postup sa vzťahuje na meranie výrastkov na prvom lúči plutvy (poradové čísla lúčov análnej plutvy sa v rámci tohto štandardného operačného postupu počítajú od zadného konca análnej plutvy).

1. Po vyrezaní pečene (dodatok 6) sa mŕtve telo vloží do kužeľovej banky, ktorá obsahuje približne 10 ml 10 % neutrálneho tlmeného formalínu (smerom hore: hlava, smerom dolu: chvost). Ak sa gonáda fixuje inak než v 10 % neutrálnym tlmeným formalínom, je potrebné mŕtve telo rozrezať priečnym rezom medzi prednou časťou análnej plutvy a análnym otvorom pomocou žiletky, pričom treba dbať, aby sa nenarušil gonopór ani samotná gonáda (obrázok 3). Kraniálna strana tela ryby sa vloží do fixačného roztoku na konzervovanie gonád a chvostová strana tela ryby do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu, ako už bolo opísané.

2. Po vložení tela ryby do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu sa uchopí predná časť análnej plutvy pomocou pinzety a ohne sa približne na 30 sekúnd, aby sa plutva roztiahla. Pri uchopení análnej plutvy pomocou pinzety uchopte opatrne niekoľko lúčov plutvy v prednej časti, aby sa nepoškodili papilárne procesy.

3. Po roztiahnutí análnej plutvy približne na 30 sekúnd sa telo ryby uloží do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu pri izbovej teplote, až do začiatku merania papilárnych procesov (meranie by sa malo vykonať po fixovaní v dĺžke najmenej 24 hodín).

Meranie

1. Po fixovaní tela ryby v 10 % neutrálnom tlmenom formalíne najmenej 24 hodín sa mŕtve telo ryby vyberie z kužeľovej banky a formalín sa otrie filtračným papierom (alebo papierovou utierkou).

2. Ryba sa položí brušnou stranou nahor. Potom sa pomocou malých pitevných nožníc opatrne odreže análna plutva (odporúča sa odrezať análnu plutvu aj s malou časťou opornej kosti pterygiophore).

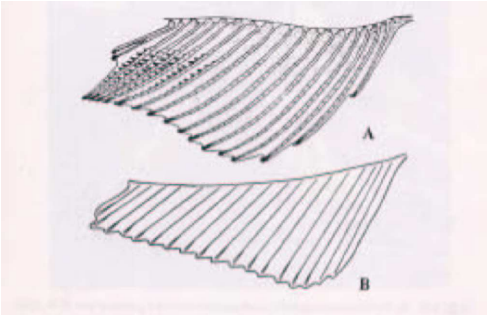
3. Oddelená análna plutva sa pinzetou uchopí za prednú časť a položí sa na podložné sklíčko s niekoľkými kvapkami vody. Potom sa plutva zakryje krycím sklíčkom. Pri uchopení análnej plutvy pomocou pinzety je potrebné dávať pozor, aby sa nepoškodili papilárne procesy.

4. Pomocou počítadla pod biologickým mikroskopom (stojanovým alebo inverzným) sa určí počet spojených platničiek s papilárnymi procesmi. Papilárne procesy sa vykazujú, keď je na zadnom okraji spojenej platničky viditeľné malé zoskupenie výrastkov. Do pracovného hárku sa zapíše počet spojených platničiek s papilárnymi procesmi na každom lúči plutvy (napr. prvý lúč plutvy: 0, druhý lúč plutvy: 10, tretí lúč plutvy: 12 atď.) a v tabuľke programu Excel sa uvedie súčet týchto počtov pre jednotlivé ryby. V prípade potreby sa urobí fotografia análnej plutvy a počet spojených platničiek s papilárnymi procesmi sa určí z tejto fotografie.

5. Po meraní sa análna plutva vloží do kužeľovej banky opísanej v bode 1 a odloží sa.

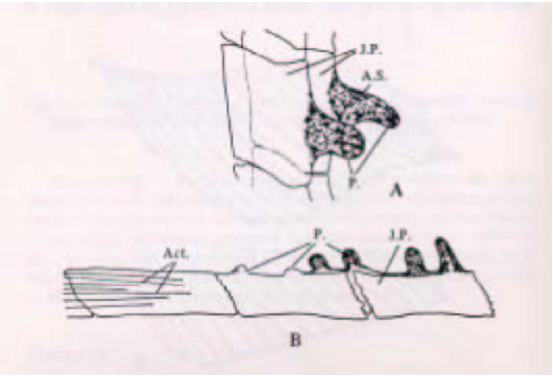
Obr. 1.

Obrázok znázorňujúci rozdiely medzi pohlaviami, pokiaľ ide o tvar a veľkosť análnej plutvy. A: samček, B: samička. 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.



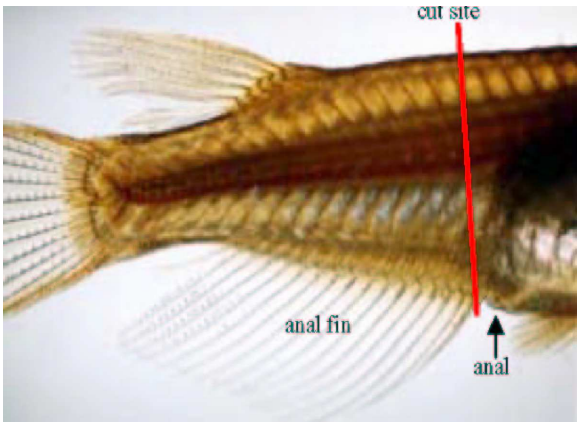
Obr. 2.

A, Procesy na spojených platničkách lúča análnej plutvy. J.P.: spojená platnička, A.S.: axiálny priestor, P.: proces B, Distálny koniec lúča plutvy. Na úplnom konci sú lúče plutvy actinotrichia (Act.). 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.



Obr. 3.

Fotografia tela ryby, ktorá znázorňuje miesto rezu v prípade, že sa gonáda fixuje v inom fixačnom roztoku, než je 10 % neutrálny tlmený formalín. V takom prípade sa telo rozreže medzi prednou časťou análnej plutvy a análnym otvorom pomocou žiletky (červená čiara), hlavová strana tela ryby sa vloží do fixačného roztoku na konzervovanie gonád a chvostová strana tela ryby sa vloží do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu.



Dodatok 6

Odporúčané postupy odberu vzoriek na analýzu vitelogenínu

Je potrebné dbať na to, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii medzi vzorkami vitelogenínu samčekov a samičiek.

Postup 1A: Čerebľa potočná, odber krvi z chvostovej žily/tepny

Po anestetizovaní sa čepeľou skalpela nareže chvostový pedunkulus a pomocou heparinizovanej mikrohematokritovej kapilárnej kanyly sa odoberie krv z chvostovej tepny/žily. Po odobratí krvi sa rýchlo izoluje plazma odstreďovaním počas troch minút pri 15 000 *g* (alebo alternatívne počas desiatich minút pri 15 000 g a teplote 4 ° C). Ak sa to vyžaduje, po odstreďovaní je možné stanoviť percentuálnu hodnotu hematokritu. Časť plazmy sa odoberie z mikrohematokritovej kanyly, vloží sa do odstreďovacej skúmavky spolu s 0,13 jednotky aprotinínu (inhibítor proteázy) a uchová sa pri teplote – 80 ° C, pokým nebude možné stanoviť vitelogenín. V závislosti od veľkosti čereble potočnej (závisí od pohlavia) sa objem plazmy, ktorú je možné odobrať, vo všeobecnosti pohybuje v rozmedzí 5 – 60 µl na jednu rybu (Jensen *et al.*, 2001).

Postup 1B: Čerebľa potočná, odber krvi zo srdca

Alternatívne sa krv môže odobrať srdcovou punkciou pomocou heparinizovanej striekačky (1 000 jednotiek heparínu na ml). Krv sa preloží do Eppendorfových skúmaviek (uložených na ľade) a potom sa odstredí (5 minút, 7 000 g, izbová teplota). Plazma by sa mala presunúť do čistých Eppendorfových skúmaviek (v alikvotných množstvách, ak to objem plazmy umožňuje) a rýchlo zmraziť na – 80 °C, pokým sa nevykoná analýza (Panter *et al.*, 1998).

Postup 2A: Medaka japonská, vyrezanie pečene

Vybratie testovacej ryby zo skúšobnej komory

1. Testovacia ryba by sa mala vybrať zo skúšobnej komory pomocou malého podberáka. Je potrebné dávať pozor, aby testovacia ryba nespadla do inej skúšobnej komory.

2. Testovacie ryby by sa mali v zásade vyberať v tomto poradí: kontrolná vzorka, kontrolná vzorka s rozpúšťadlom (ak je to vhodné), najnižšia koncentrácia, stredná koncentrácia, najvyššia koncentrácia a pozitívna kontrolná vzorka. Okrem toho by sa mali z každej skúšobnej komory najskôr vybrať všetci samčekovia, až potom zostávajúce samičky.

3. Pohlavie každej testovacej ryby sa určí na základe vonkajších sekundárnych pohlavných znakov (napr. tvaru análnej plutvy).

4. Testovacia ryba sa vloží do prepravného kontajnera a premiestni na pracovisko určené na vyrezanie pečene. Je potrebné skontrolovať správnosť údajov na štítkoch na skúšobnej komore a prepravnom kontajneri, aby sa potvrdilo, že počet rýb, ktoré sa vybrali zo skúšobnej komory, a počet rýb, ktoré v skúšobnej komore zostali, je v súlade s očakávaním.

5. Ak nie je možné určiť pohlavie rýb na základe ich vonkajšieho vzhľadu, vyberú sa všetky ryby zo skúšobnej komory. V tom prípade by sa pohlavie malo určiť na základe pozorovania gonád alebo sekundárnych pohlavných znakov stereoskopickým mikroskopom.

Vyrezanie pečene

1. Testovacia ryba sa preloží z prepravného kontajnera do anestetického roztoku pomocou malého podberáka.

2. Po anestetizovaní sa testovacia ryba pomocou pinzety (spotrebného druhu) uloží na filtračný papier (alebo na papierovú utierku). Rybu je potrebné uchopiť pinzetou za boky hlavy, aby sa zabránilo zlomeniu chvosta.

3. Voda z povrchu testovacej ryby sa utrie filtračným papierom (alebo papierovou utierkou).

4. Ryba sa položí brušnou stranou nahor. Potom sa pomocou pitevných nožníc urobí malý priečny zárez medzi časťou brucha v blízkosti hlavy a strednou časťou brucha.

5. Pitevné nožnice sa vložia do malého rezu a brucho sa rozstrihne pozdĺž stredovej línie od zadného bodu žiabrového krytu po kraniálnu stranu análneho otvoru. Je potrebné dávať pozor, aby sa pitevné nožnice nevložili príliš hlboko a nedošlo k poškodeniu pečene a gonád.

6. Ďalšie operácie je potrebné vykonať pomocou stereoskopického mikroskopu.

7. Testovacia ryba sa položí brušnou stranou nahor na papierovú utierku (použiť sa môže aj sklená Petriho miska alebo podložné sklíčko).

8. Pomocou presnej pinzety sa rozšíria steny brušnej dutiny a vyberú sa z nej vnútorné orgány. Je tiež prípustné, aby sa v prípade potreby vnútorné orgány vybrali odstránením jednej bočnej steny brušnej dutiny.

9. Pomocou ďalšej presnej pinzety sa odhalí spojená časť pečene a žlčníka. Potom sa uchopí žlčovod a žlčník sa odreže. Je potrebné dávať pozor, aby sa žlčník nepoškodil.

10. Uchopí sa pažerák a rovnakým spôsobom sa od pečene oddelí tráviaci trakt. Je potrebné dávať pozor, aby nedošlo k úniku obsahu tráviaceho traktu. Kaudálny tráviaci trakt sa oddelí od análneho otvoru a odstráni z brušnej dutiny.

11. Z okrajových častí pečene sa odreže tuková hmota a iné tkanivá. Je potrebné dávať pozor, aby sa pečeň nepoškodila.

12. Pečeň sa uchopí presnou pinzetou za oblasť brány a vyberie sa z brušnej dutiny.

13. Pečeň sa uloží na podložné sklíčko. V prípade potreby sa pomocou presnej pinzety odstráni z povrchu pečene akýkoľvek ďalší tuk a cudzie tkanivo (napr. výstelka brucha).

14. Hmotnosť pečene sa meria pomocou elektronických analytických váh s mikroskúmavkou 1,5 ml predstavujúcou hmotnosť obalu. Hodnota sa zaznamená do pracovného hárku (napr.: 0,1 mg). Je potrebné potvrdiť identifikačné údaje na štítku mikroskúmavky.

15. Mikroskúmavka obsahujúca pečeň sa uzavrie a uloží do chladiaceho boxu (alebo mraziaceho boxu).

16. Po vyrezaní jednej pečene je potrebné pitevné nástroje vyčistiť, alebo ich nahradiť čistými.

17. Pečeň sa odoberie z tiel všetkých rýb v prepravnom kontajneri, ako už bolo uvedené.

18. Po vyrezaní pečene z tiel všetkých rýb v prepravnom kontajneri (t. j. všetkých samčekov alebo samičiek v skúšobnej komore) sa všetky vzorky pečene uložia v skúmavkách do stojana s identifikačnými štítkami a vložia sa do mraziaceho boxu. Ak sa pečeň krátko po vyrezaní venuje na predúpravu, vzorky sa na nasledujúce pracovisko prenášajú v chladiacom boxe (alebo mraziacom boxe).

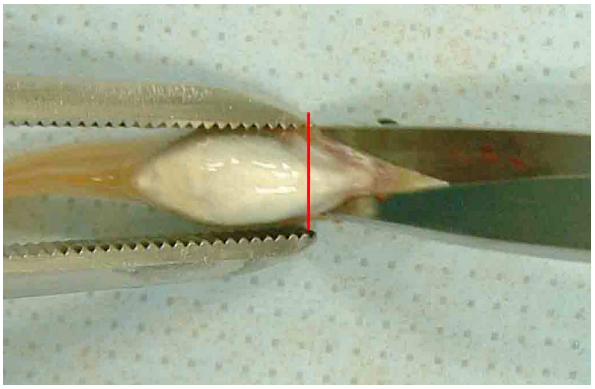
Po vyrezaní pečene je mŕtve telo ryby k dispozícii na meranie sekundárnych pohlavných znakov.

Vzorka

Ak sa vzorky pečene nepoužijú na predúpravu krátko po vyrezaní z tela testovacej ryby, musia sa skladovať pri teplote ≤ – 70 °C.

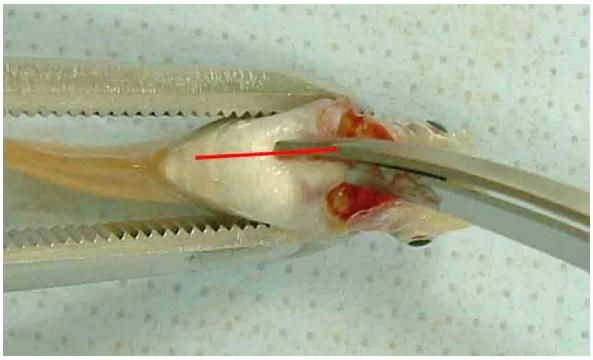
Obrázok 1

Nožnicami sa urobí rez tesne pred prsnými plutvami.



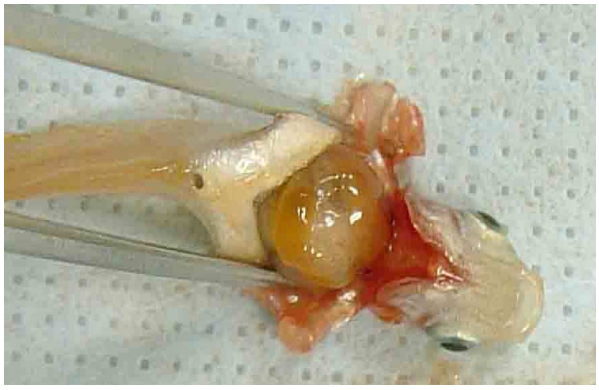
Obrázok 2

Stredová línia brucha sa nožnicami rozstrihne k bodu približne 2 mm od kraniálnej strany análneho otvoru.



Obrázok 3

Pomocou pinzety sa rozšíria steny brušnej dutiny a odhalí sa pečeň a ďalšie vnútorné orgány. (Alternatívne sa steny brušnej dutiny môžu zboku pripevniť).



Obrázok 4

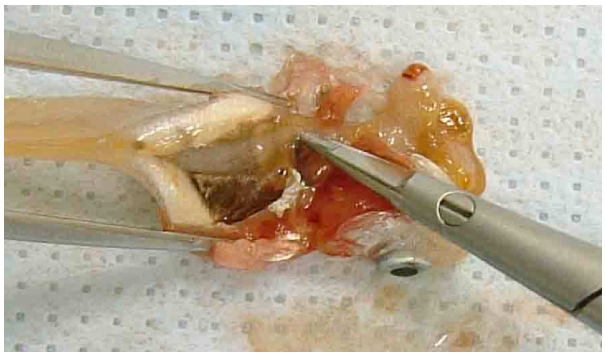
Pečeň sa vyberie a vyreže priamo pomocou pinziet.

Obrázok 5

Črevá sa jemne odtiahnu pomocou pinzety.

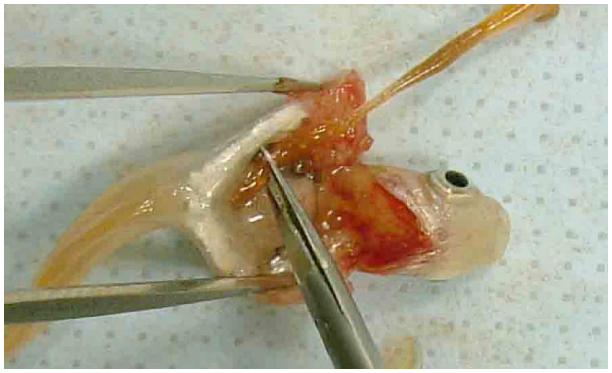
Obrázok 6

Obidva konce čriev a akékoľvek mezenteriálne pripojenia sa oddelia pomocou nožníc.



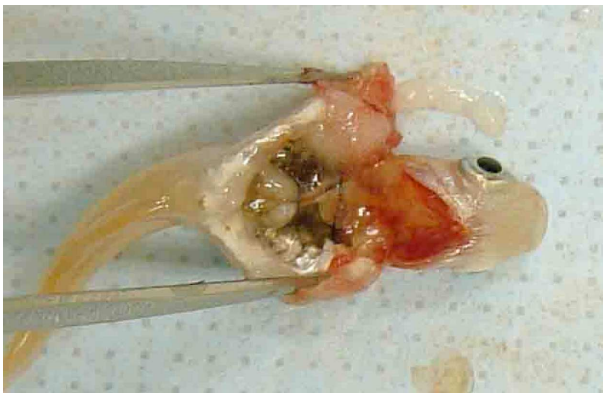
Obrázok 7 (samička)

Postup v prípade samičiek je rovnaký.



Obrázok 8

Postup je ukončený.



Postup 2 B: Medaka japonská (*Oryzias latipes*), predbežná úprava pečene na analýzu vitelogenínu

Zo súpravy ELISA sa vyberie fľaša tlmivého roztoku homogenátu a ochladí sa rozdrveným ľadom (teplota roztoku: ≤ 4 °C). Ak sa použije tlmivý roztok homogenátu zo systému EnBio ELISA, nechá sa rozmraziť pri izbovej teplote a potom sa fľaša ochladí rozdrveným ľadom.

Vypočíta sa objem tlmivého roztoku homogenátu pre pečeň na základe jej hmotnosti (pre homogenát sa pridá 50 µl tlmivého roztoku homogenátu na 1 mg hmotnosti pečene). Napríklad ak je hmotnosť pečene 4,5 mg, objem tlmivého roztoku homogenátu pre pečeň je 225 µl. Je potrebné vypracovať zoznam objemu tlmivého roztoku homogenátu pre všetky pečene.

Príprava pečene na predúpravu

1. Tesne pred predúpravou sa z mraziaceho boxu vyberie 1,5 ml mikroskúmavka obsahujúca pečeň.

2. Predúprava pečene samčekov by sa mala vykonať pred úpravou pečene samičiek, aby sa zabránilo kontaminácii vitelogenínu. Okrem toho, predúprava pre testovacie skupiny by sa mala vykonať v tomto poradí: kontrolná vzorka, kontrolná vzorka s rozpúšťadlom (ak je to vhodné), najnižšia koncentrácia, stredná koncentrácia, najvyššia koncentrácia a pozitívna kontrolná vzorka.

3. Počet 1,5 ml mikroskúmaviek so vzorkami pečene, ktoré sa v danom čase vyberú z mraziaceho boxu, by nemal prekročiť počet 1,5 ml mikroskúmaviek, ktoré sa môžu v danom čase odstreďovať.

4. 1,5 ml mikroskúmavky so vzorkami pečene sa uložia v poradí podľa čísel vzoriek v mraziacom boxe (nie je potrebné pečeň rozmrazovať).

Postup predúpravy

1. Pridanie homogenizačného tlmivého roztoku

   1. Podľa zoznamu sa zistí objem tlmivého roztoku homogenátu, ktorý sa má použiť pre konkrétnu vzorku pečene, a mikropipeta sa nastaví na príslušný objem (rozsah objemu: 100 – 1 000 µl). Na mikropipetu sa nasadí čistý hrot.

   2. Tlmivý roztok homogenátu sa odoberie z fľaše reaktantu a pridá sa do 1,5 ml mikroskúmavky obsahujúcej pečeň.

   3. Uvedeným postupom sa tlmivý roztok homogenátu pridá do všetkých 1,5 ml mikroskúmaviek obsahujúcich pečeň. Nie je potrebné meniť hrot mikropipety za nový. Ak je však hrot kontaminovaný, alebo by mohol byť kontaminovaný, mal by sa vymeniť.

2. Homogenizácia pečene

1. Na homogenizátor mikroskúmaviek sa nasadí nové miešadlo na homogenizáciu.

2. Do 1,5 ml mikroskúmavky sa vloží miešadlo. Homogenizátor sa drží tak, aby bola pečeň pritlačená medzi povrch miešadla a vnútornú stenu mikroskúmavky.

3. Homogenizátor sa uvedie do prevádzky na 10 – 20 sekúnd. Počas prevádzky je potrebné chladiť mikroskúmavku rozdrveným ľadom.

4. Miešadlo sa vytiahne z 1,5 ml mikroskúmavky a nechá sa v pokoji približne 10 sekúnd. Potom sa vykoná vizuálna kontrola stavu suspenzie.

5. Ak sa v suspenzii pozorujú kúsky pečene, je potrebné opakovať operácie 3 a 4, aby sa pripravil uspokojivý homogenát pečene.

6. Suspendovaný homogenát pečene sa chladí v mraziacom boxe až do odstredenia.

7. Pre každý homogenát je potrebné vymeniť miešadlo za nové.

8. Uvedeným postupom sa zhomogenizujú všetky pečene s tlmivým roztokom homogenátu.

3. Odstreďovanie suspendovaného homogenátu pečene

1. Je potrebné overiť, či je teplota v chladenej komore centrifúgy ≤ 5 °C.

2. Do chladenej centrifúgy sa vložia 1,5 ml mikroskúmavky obsahujúce suspendovaný homogenát pečene (v prípade potreby sa upraví rovnováha).

3. Suspendovaný homogenát pečene sa odstreďuje 10 minút pri 13 000 *g* a teplote ≤ 5 °C. Ak sú však supernatanty dostatočne oddelené, sila a čas odstreďovania sa môžu upraviť podľa potreby.

4. Po odstredení je potrebné skontrolovať, či sú supernatanty primerane oddelené (povrchová vrstva: tuk, stredná vrstva: supernatant, spodná vrstva: tkanivo pečene). Ak oddelenie nie je primerané, suspenzia sa opäť odstredí za tých istých podmienok.

5. Všetky vzorky sa vyberú z chladenej centrifúgy a uložia v poradí podľa čísel vzoriek v mraziacom boxe. Je potrebné dať pozor, aby sa znovu nesuspendovali vrstvy oddelené po odstreďovaní.

4. Odber supernatantu

1. Do stojana na skúmavky sa vložia štyri 0,5 ml mikroskúmavky na uloženie supernatantu.

2. Z každého supernatantu (oddeleného ako stredná vrstva) sa pomocou mikropipety odoberie 30 µl a vloží sa do jednej 0,5 ml mikroskúmavky. Je potrebné dať pozor, aby sa neodobral tuk z povrchovej vrstvy alebo tkanivo pečene zo spodnej vrstvy.

3. Supernatant sa odoberie a rozdelí do dvoch ďalších 0,5 ml mikroskúmaviek rovnakým spôsobom, ako už bolo uvedené.

4. Zvyšok supernatantu sa odoberie pomocou mikropipety (ak je to možné: ≥ 100 µl). Vloží sa do poslednej 0,5 ml mikroskúmavky. Je potrebné dať pozor, aby sa neodobral tuk z povrchovej vrstvy alebo tkanivo pečene zo spodnej vrstvy.

5. 0,5 ml mikroskúmavka sa uzavrie a na štítok sa napíše objem supernatantu. Hneď potom sa mikroskúmavky ochladia v mraziacom boxe.

6. Hrot mikropipety sa vymení za nový pre každý supernatant. Ak sa na hrote usadí veľké množstvo tuku, je potrebné ho ihneď vymeniť, aby sa zabránilo kontaminácii pečeňového extraktu tukom.

7. Všetky odstredené supernatanty sa uvedeným postupom vložia do štyroch 0,5 ml mikroskúmaviek.

8. Všetky 0,5 ml mikroskúmavky sa po vložení supernatantu uložia do stojana s identifikačnými štítkami a potom sa okamžite zmrazia v mraziacom boxe. Ak sa koncentrácie vitelogenínu merajú ihneď po predúprave, jedna 0,5 ml mikroskúmavka (obsahujúca 30 µl supernatantu) sa drží v chladenom stojane a potom sa premiestni na pracovisko, kde sa vykonáva test ELISA. V takom prípade sa zostávajúce mikroskúmavky uložia do stojanov a zmrazia v mraziacom boxe.

9. Po odbere supernatantu sa zvyšok primerane zlikviduje.

Uskladnenie vzoriek

0,5 ml mikroskúmavky obsahujúce supernatant homogenátu pečene sa udržiavajú pri teplote ≤ – 70 °C, až kým sa nepoužijú na test ELISA.

Postup 3A: Dánio pruhované, odber krvi z chvostovej žily/tepny

Bezprostredne po anestéze sa priečne nareže chvostový pedunkulus a pomocou heparinizovanej mikrohematokritovej kapilárnej kanyly sa odstráni krv z chvostovej tepny/žily. Objemy krvi sa pohybujú v rozmedzí od 5 do 15 µl v závislosti od veľkosti rýb. Rovnaký objem tlmivého roztoku aprotinínu (6 µgml vo fosfátovom tlmivom fyziologickom roztoku) sa pridá do mikrokapilárnej skúmavky a z krvi sa odstreďovaním oddelí plazma (5 minút pri 600 g). Plazma sa odoberie do testovacích skúmaviek a udržiava sa pri teplote – 20 °C, až kým sa nezačne analyzovať na prítomnosť vitelogenínu alebo iných skúmaných proteínov.

Postup 3B: Dánio pruhované, odber krvi srdcovou punkciou

S cieľom zabrániť zrážaniu krvi a degradácii proteínov sa vzorky odoberajú vo fosfátovom tlmivom fyziologickom roztoku (PBS) obsahujúcom heparín (1 000 jednotiek/ml) a inhibítor proteázy aprotinín (2 TIU/ml). Ako prísady do tlmivého roztoku sa odporúčajú heparín amóniová soľ a lyofilizovaný aprotinín. Na odber vzoriek krvi sa odporúča striekačka (1 ml) s pevnou tenkou ihlou (napr. Braun Omnikan-F). Striekačka by sa mala vopred naplniť tlmivým roztokom (približne 100 µl), aby sa úplne eluovali malé objemy krvi z každej ryby. Vzorky krvi sa odoberajú srdcovou punkciou. Ryba by sa mala najskôr anestetizovať s MS-222 (100 mg/l). Správna hladina anestézie umožňuje používateľovi rozpoznať tlkot srdca dánia pruhovaného. Pri punkcii srdca je potrebné držať piest striekačky pod miernym tlakom. Objem krvi, ktorú je možné odobrať, sa pohybuje v rozsahu 20 – 40 mikrolitrov. Po srdcovej punkcii by sa mala testovacia skúmavka naplniť zmesou krvi a tlmivého roztoku. Plazma sa z krvi oddelí odstreďovaním (20 min, 5 000 g) a mala by sa udržiavať pri teplote – 80 °C, až kým sa nezačne analyzovať.

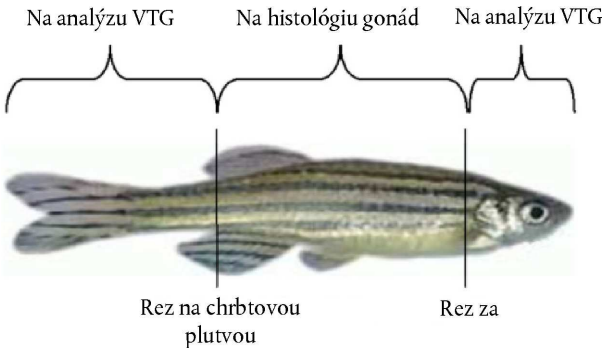
Postup 3C:Štandardný operačný postup: Dánio pruhované, homogenizácia hlavy a chvosta

1. Ryba sa anestetizuje a usmrtí v súlade s opisom testu.

2. Hlava a chvost sa odrežú z tela ryby podľa obrázka 1.

Upozornenie: Všetky pitevné nástroje a doska na rezanie by sa mali medzi spracovávaním jednotlivých rýb riadne opláchnuť a vyčistiť (napr. 96 % etanolom), aby sa zabránilo ‚vitelogenínovému znečisteniu' neindukovaných samčekov od samičiek alebo indukovaných samčekov.

Obrázok 1



3. Celková hmotnosť hlavy a chvosta z každej ryby sa meria s presnosťou na miligramy.

4. Po odvážení sa jednotlivé časti vložia do príslušných skúmaviek (napr. 1,5 ml Eppendorfovej) a zmrazia sa pri teplote – 80 °C až do homogenizácie, alebo sa homogenizujú priamo na ľade pomocou dvoch plastových miešadiel. (Môžu sa použiť aj iné metódy, ak sa vykonávajú na ľade a výsledkom je homogénna hmota). Upozornenie: Skúmavky by mali byť riadne očíslované tak, aby bolo možné hlavu a chvost ryby priradiť k časti tela, ktorá sa používa na histológiu gonád.

5. Keď sa dosiahne homogénna hmota, pridá sa ľadový homogenizačný tlmivý roztok (*) predstavujúci štvornásobok hmotnosti tkaniva. Zmes sa ďalej spracováva miešadlami, kým nie je homogénna. Dôležitá poznámka: Pre každú jednotlivú rybu sa používajú nové miešadlá.

6. Vzorky sú uložené na ľade až do začiatku 30-minútového odstreďovania pri teplote 4 °C a 50 000 × g.

7. Na vloženie dávok 20 µl supernatantu do najmenej dvoch skúmaviek sa použije pipeta. Hrot pipety sa prestrčí pod vrstvu tuku na povrchu a opatrne sa odsaje supernatant bez tukových alebo tuhých frakcií.

8. Skúmavky sa pred použitím skladujú pri teplote – 80 °C.

(*) **Homogenizačný tlmivý roztok:**
— [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % zmes inhibítora proteázy (Sigma)]: 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl zmes inhibítora proteázy.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) napríklad od Bie & Berntsen, Dánsko.
— zmes inhibítora proteázy: od Sigma (pre tkanivá cicavcov), číslo výrobku P 8340.
— *Poznámka:* Homogenizačný tlmivý roztok by sa mal použiť v deň, keď bol pripravený. Počas použitia musí byť uložený na ľade.

Dodatok 7

Obohatené vzorky vitelogenínu a referenčná látka-štandard

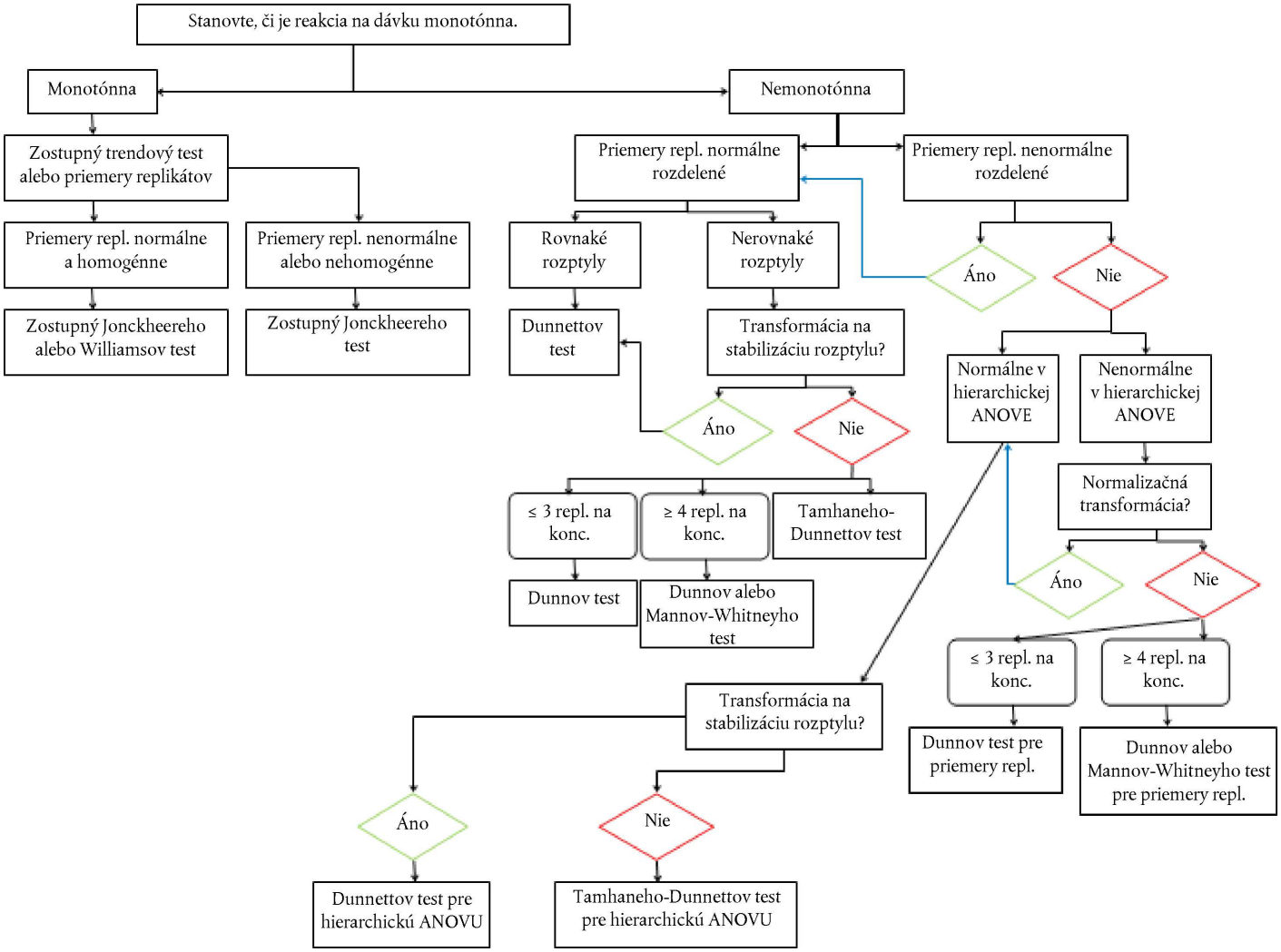
Každý deň, keď sa vykonávajú testy na zistenie vitelogenínu, sa budú analyzovať obohatené vzorky pripravené na základe referenčnej látky-štandard. Vitelogenín použitý na prípravu referenčnej látky-štandard musí pochádzať z inej dávky než vitelogenín použitý na prípravu kalibračných štandardov pre vykonávaný test.

Obohatená vzorka sa pripraví pridaním známeho množstva štandardu do kontrolnej vzorky plazmy samčekov. Vzorka sa obohatí tak, aby sa dosiahla koncentrácia vitelogenínu 10- až 100-násobná oproti očakávanej koncentrácii v kontrolnej vzorke samčekov rýb. Kontrolná vzorka plazmy samčekov, ktorá sa obohatí, môže pochádzať od jednej ryby alebo môže byť zmesou od viacerých rýb.

Čiastková vzorka neobohatenej vzorky plazmy samčekov sa bude analyzovať najmenej v dvoch duplicitných súboroch. Obohatená vzorka sa tiež bude analyzovať najmenej v dvoch duplicitných súboroch. Stredné množstvo vitelogenínu v dvoch neobohatených kontrolných vzorkách plazmy samčekov sa pridá k vypočítanému množstvu vitelogenínu pridanému na obohatenie vzoriek s cieľom stanoviť očakávanú koncentráciu. Spolu s výsledkami z každého súboru testov vykonaných v daný deň sa uvádza pomer tejto očakávanej koncentrácie a nameranej koncentrácie.

Dodatok 8

Schéma rozhodovania pre štatistickú analýzu



C.38. SKÚŠKA METAMORFÓZY OBOJŽIVELNÍKOV

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 231 (2009). Potreba vyvinúť a validovať skúšku schopnú zistiť chemikálie pôsobiace v systéme štítnej žľazy stavovcov vyplýva z obavy, že úrovne chemikálií v životnom prostredí môžu spôsobiť nepriaznivé účinky u ľudí aj voľne žijúcich živočíchov. Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala činnosť s vysokou prioritou s cieľom vykonať revíziu existujúcich usmernení a vypracovať nové usmernenia na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov. Jednou zložkou tejto činnosti bolo vytvoriť usmernenie na skríning chemikálií pôsobiacich na systém štítnej žľazy stavovcov. Navrhlo sa rozšírenie 28-dňovej štúdie orálnej toxicity po opakovanom podaní pri hlodavcoch (kapitola B.7 tejto prílohy) a skúška metamorfózy obojživelníkov (AMA). Rozšírená testovacia metóda B.7 prešla validáciou a bola vydaná revidovaná testovacia metóda. Skúška metamorfózy obojživelníkov (AMA) prešla rozsiahlym programom validácie, ktorého súčasťou boli vnútrolaboratórne a medzilaboratórne štúdie, ktoré preukázali význam a spoľahlivosť skúšky (1, 2). Validácia skúšky bola následne predmetom partnerského preskúmania panelom nezávislých odborníkov (3). Táto testovacia metóda je výsledkom skúseností získaných počas validačných štúdií zameraných na zisťovanie chemikálií pôsobiacich v štítnej žľaze a práce vykonanej v členských krajinách OECD.

PRINCÍP TESTU

2. Skúška metamorfózy obojživelníkov (AMA) je skríningová skúška určená na empirickú identifikáciu chemikálií, ktoré môžu narušať normálnu funkciu osi hypotalamus – hypofýza – štítna žľaza (HPT). AMA predstavuje všeobecný model pre stavovce, lebo je založená na zachovaných štruktúrach a funkciách osi HPT. Je to dôležitá skúška, lebo metamorfóza obojživelníkov predstavuje dobre preskúmaný proces závislý od štítnej žľazy, ktorý reaguje na chemikálie pôsobiace v rámci osi HPT. Ide o jedinú existujúcu skúšku, ktorou sa zisťuje pôsobenie na štítnu žľazu pri živočíchovi prechádzajúcom morfologickým vývinom.

3. Všeobecná koncepcia pokusu zahŕňa expozíciu žubrienok druhu *Xenopus laevis* v štádiu 51 minimálne trom rôznym koncentráciám testovanej chemikálie a kontrolnej riediacej vode počas 21 dní. Každá testovaná koncentrácia sa testuje v štyroch replikátoch. Hustota lariev na začiatku testu je 20 žubrienok na testovaciu nádrž pre všetky skupiny s aplikovanou chemikáliou. Pozorovacie sledované parametre sú dĺžka zadných končatín, dĺžka od pysku po kloaku (SVL), vývinové štádium, mokrá hmotnosť, histológia štítnej žľazy a každodenné pozorovania úmrtnosti.

OPIS METÓDY

Testovací druh

4. *Xenopus laevis* sa bežne kultivuje v laboratóriách na celom svete a je ľahko dostupný prostredníctvom komerčných dodávateľov. Pri tomto druhu sa po celý rok ľahko vyvoláva rozmnožovanie pomocou injekcií ľudského chorionického gonadotropínu (hCG) a výsledné larvy sa rutinne vo veľkom počte chovajú až po vybraté vývinové štádiá, čo umožňuje použitie testovacích protokolov špecifických pre dané štádium. Najvhodnejšie je na skúšku použiť larvy pochádzajúce z interných dospelých jedincov. Alternatívne si laboratórium vykonávajúce test môže objednať vajíčka alebo embryá, ktorým musí umožniť aklimatizáciu, tento postup však nie je najvhodnejší. Použitie dodaných larválnych štádií v teste je neprijateľné.

Vybavenie a spotrebný materiál

5. Na vykonanie tejto skúšky je potrebné toto vybavenie a spotrebný materiál:

   a) expozičný systém (pozri opis ďalej);

   b) akváriá zo skla alebo nehrdzavejúcej ocele (pozri opis ďalej);

   c) chovné nádrže;

   d) prístroje na reguláciu teploty [napr. ohrievače alebo chladiče (nastaviteľné na teplotu 22 °C ± 1 °C)];

e) teplomer;

f) binokulárny disekčný mikroskop;

g) digitálna kamera s rozlíšením aspoň 4 megapixle a s funkciou mikro;

h) softvér na digitalizáciu obrazu;

i) Petriho miska (napr. 100 × 15 mm) alebo priehľadná plastová komora porovnateľnej veľkosti;

j) analytické váhy schopné merať na tri desatinné miesta (mg);

k) prístroj na meranie rozpusteného kyslíka;

l) pH-meter;

m) prístroj na meranie intenzity svetla schopný merať v luxoch;

n) rôzne laboratórne sklo a nástroje;

o) nastaviteľné pipety (10 – 5 000 µl) alebo rôzne pipety zodpovedajúcich veľkostí;

p) testovaná chemikália v dostatočnom množstve na vykonanie štúdie, podľa možnosti z jednej šarže;

q) analytické prístroje vhodné pre testovanú chemikáliu alebo zmluvné analytické služby.

Chemická testovateľnosť

6. Skúška AMA je založená na protokole vodnej expozície, podľa ktorého sa testovaná chemikália privádza do testovacích komôr pomocou prietokového systému. Prietoková metóda však znamená obmedzenie druhov chemikálií, ktoré možno testovať, na základe fyzikálno-chemických vlastností chemikálie. Pred použitím tohto protokolu by sa preto mali získať základné informácie o chemikálii potrebné na určenie testovateľnosti a mal by sa prečítať usmerňovací dokument OECD o testovaní vodnej toxicity ťažkých látok a zmesí (4). Medzi vlastnosti, ktoré naznačujú, že chemikáliu môže byť ťažké testovať vo vodných systémoch, patria: vysoká rozdeľovacia konštanta oktanol/voda (log Kow), vysoká prchavosť, náchylnosť na hydrolýzu a náchylnosť na fotolýzu v laboratórnych podmienkach osvetlenia. Z hľadiska určenia testovateľnosti môžu mať význam aj iné faktory, ktoré by sa mali stanoviť pre každý jednotlivý prípad. Ak nie je možné úspešne otestovať danú chemikáliu pomocou prietokového testovacieho systému, možno použiť statický obnovovací systém. Ak ani jeden z týchto systémov nie je vhodný pre testovanú chemikáliu, štandardným postupom je netestovať ju pomocou tohto protokolu.

Expozičný systém

7. Podľa možnosti sa uprednostňuje prietokový zrieďovací systém pred statickým obnovovacím systémom. Ak fyzikálne a/alebo chemické vlastnosti niektorej z testovaných chemikálií nevyhovujú použitiu prietokového zrieďovacieho systému, možno použiť alternatívny expozičný (napr. statický obnovovací) systém. Komponenty systému, ktoré prichádzajú do kontaktu s vodou, by mali byť zo skla, nehrdzavejúcej ocele a/alebo polytetrafluóretylénu. Možno však použiť aj vhodné plasty, ak to nenaruší štúdiu. Expozičné nádrže by mali byť akváriá zo skla alebo nehrdzavejúcej ocele vybavené zvislými trubicami s približným objemom nádrže 4,0 – 10,0 l a minimálnou hĺbkou vody 10 – 15 cm. Systém by mal byť schopný podporovať všetky expozičné koncentrácie a kontrolu, a to v štyroch replikátoch na testovanú koncentráciu. Prietok v každej nádrži má byť konštantný, aby sa zachovali stabilné biologické podmienky a expozícia chemikálii (napr. 25 ml/min.). Testovacie nádrže by sa mali náhodne prideliť na určitú pozíciu v expozičnom systéme, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy pozície vrátane miernych odchýlok v teplote, intenzite svetla atď. Malo by sa použiť žiarivkové osvetlenie na zabezpečenie fotoperiódy 12 hodín svetla: 12 hodín tmy pri intenzite v rozsahu 600 – 2 000 luxov (lumen/m^2) na povrchu vody. Voda by sa mala udržiavať pri teplote 22 °C ± 1 °C, pH medzi 6,5 – 8,5 a koncentrácia rozpusteného kyslíka > 3,5 mg/l (> 40 % rozpustnosť vzdušného kyslíka) v každej testovacej nádrži. Keďže minimálna teplota vody, pH a rozpustený kyslík by sa mali merať raz za týždeň, ideálne by sa aspoň v jednej testovacej nádobe mala teplota merať nepretržite. V dodatku 1 sa uvádzajú podmienky pokusu, za ktorých by sa protokol mal vykonať. Ďalšie informácie o inštalácii prietokových expozičných systémov a/alebo statických obnovovacích systémov sa nachádzajú v štandardnom usmernení ASTM na vykonávanie testov akútnej toxicity na testovaných materiáloch pre ryby, makrobezstavovce a obojživelníky (5) a vo všeobecných vodných toxikologických testoch.

Kvalita vody

8. Možno použiť akúkoľvek na mieste dostupnú vodu (napr. pramenistú vodu alebo vodu z vodovodu filtrovanú pomocou drevného uhlia), ktorá umožňuje normálny rast a vývin žubrienok *X. laevis*. Keďže kvalita miestnej vody sa môže medzi jednotlivými oblasťami výrazne líšiť, mala by sa vykonať analýza kvality vody, najmä ak nie sú dostupné historické údaje o použiteľnosti vody na chov rodu *Xenopus*. Osobitná pozornosť by sa mala venovať tomu, aby voda neobsahovala meď, chlór a chloramíny, ktoré sú toxické pre žaby a žubrienky. Ďalej sa odporúča vykonať analýzu vody z hľadiska hodnoty pozadia pre fluorid, perchlorát a chlorát (vedľajší produkt dezinfekcie pitnej vody), pretože všetky tieto anióny sú substráty jódového transportéra štítnej žľazy a ich zvýšená hladina môže narušiť výsledok štúdie. Analýza by sa mala vykonať pred začatím testovania a testovacia voda by za normálnych okolností nemala obsahovať tieto anióny.

Koncentrácia jodidu v testovacej vode

9. Na to, aby štítna žľaza mohla tvoriť hormón štítnej žľazy, larvy musia mať k dispozícii dostatok jodidu z kombinácie vodných a potravných zdrojov. V súčasnosti neexistujú empiricky odvodené usmernenia pre minimálne koncentrácie jodidu. Dostupnosť jodidu však môže ovplyvniť schopnosť systému štítnej žľazy reagovať na látky pôsobiace v štítnej žľaze a je známe, že jodid reguluje základnú činnosť štítnej žľazy, čo je aspekt, ktorý si zaslúži pozornosť pri interpretácii výsledkov histopatologického vyšetrenia štítnej žľazy. Preto je nutné v správe uviesť namerané koncentrácie jodidu v testovacej vode. Na základe dostupných údajov z validačných štúdií protokol preukázateľne dobre funguje pri koncentrácii jodidu (I^-) v testovacej vode medzi 0,5 a 10 µg/l. V ideálnom prípade by minimálna koncentrácia jodidu v testovacej vode mala byť 0,5 µg/l. Ak sa testovacia voda rekonštituuje z deionizovanej vody, mal by sa pridať jód na dosiahnutie minimálnej koncentrácie 0,5 µg/l. Každé ďalšie pridanie jódu alebo iných solí do testovacej vody by sa malo zaznamenať do správy.

Chov živočíchov

Párenie dospelých jedincov a starostlivosť o ne

10. Párenie dospelých jedincov a starostlivosť o ne sa vykonávajú v súlade so štandardnými usmerneniami. Podrobnejšie informácie sa nachádzajú v štandardných usmerneniach na vykonanie skúšky teratogenézy žabích embryí (FETAX) (6). Tieto štandardné usmernenia sú príkladom vhodných metód starostlivosti a párenia, ale nevyžaduje sa ich prísne dodržiavanie. Na vyvolanie párenia sa párom (3 – 5) dospelých samičiek a samčekov vstrekne ľudský chorionický gonadotropín (hCG). Samičkám sa vstrekne približne 800 – 1 000 IU a samčekom približne 600 – 800 IU hCG rozpusteného v 0,6 – 0,9 % fyziologickom roztoku. Pária sa páry sa držia vo veľkých nádržiach nerušené a za statických podmienok, aby sa podporil amplexus. Na spodku každej rozmnožovacej nádrže by malo byť falošné dno vytvorené zo siete z nehrdzavejúcej ocele alebo plastu, ktoré umožňuje padanie vajíčkových más na spodok nádrže. Žaby, ktoré dostali injekciu neskoro popoludní, zvyčajne nakladú väčšinu vajíčok v polovici dopoludnia nasledujúceho dňa. Po uvoľnení a oplodnení dostatočného množstva vajíčok je potrebné vybrať dospelých jedincov z rozmnožovacích nádrží.

Starostlivosť o larvy a ich výber

11. Po vybratí dospelých jedincov z rozmnožovacích nádrží sa vajíčka pozbierajú a vyhodnotia z hľadiska životaschopnosti pomocou reprezentatívnej podvzorky embryí zo všetkých rozmnožovacích nádrží. Najlepšie jednotlivé znášky (odporúčajú sa dve až tri na vyhodnotenie kvality znášok) na základe životaschopnosti embryí a prítomnosti dostatočného počtu (najmenej 1 500) embryí sa zachovajú. Všetky organizmy použité v štúdii by mali pochádzať z jednej znášky (t. j. znášky by sa nemali miešať dohromady). Embryá sa prenesú na veľkú plochú podložku alebo misku a všetky zjavne mŕtve alebo abnormálne vajíčka [pozri vymedzenie v literatúre (5)] sa odstránia pomocou pipety alebo očného kvapkadla. Kvalitné embryá z každej z troch znášok sa prenesú do troch samostatných nádrží na liahnutie. Štyri dni po umiestnení do nádrží na liahnutie sa na základe životaschopnosti a úspešného vyliahnutia vyberie najlepšia znáška a larvy sa prenesú do primeraného počtu chovných nádrží s teplotou 22 °C ± 1 °C. Okrem toho sa niekoľko ďalších lariev prenesie do iných nádrží na použitie ako náhrady v prípade, že v chovných nádržiach dôjde počas prvého týždňa k úmrtnosti. Týmto postupom sa zachová stabilná hustota organizmov, čím sa znížia rozdiely vo vývine v kohorte z jednej znášky. Všetky chovné nádrže sa musia každý deň dočista vysať. Ako preventívne opatrenie sa namiesto latexových rukavíc odporúča použiť vinylové alebo nitrilové rukavice. Uhynuté larvy sa odstraňujú každý deň a následne sa dopĺňajú náhradné larvy, aby sa počas prvého týždňa zachovala hustota organizmov. Kŕmenie by sa malo vykonávať aspoň dvakrát denne.

12. Počas predexpozičnej fázy sa žubrienky aklimatizujú na podmienky expozičnej fázy vrátane druhu potravy, teploty, cyklu svetla a tmy a kultivačného média. Preto sa odporúča použiť v predexpozičnej i expozičnej fáze rovnakú kultivačnú/riediacu vodu. Ak sa na chov žubrienok v predexpozičnej fáze používa statický kultivačný systém, kultivačné médium by sa malo vymieňať kompletne aspoň dvakrát týždenne. Je potrebné vyhnúť sa nadmernej hustote žubrienok spôsobenej vysokou hustotou lariev v období pred expozíciou, pretože môže zásadne ovplyvniť vývin žubrienok počas nasledujúcej testovacej fázy. Hustota počas chovu by preto nemala presiahnuť približne štyri žubrienky/l kultivačného média (statický expozičný systém) alebo desať žubrienok/l kultivačného média (s prietokom v predexpozičnom alebo kultivačnom systéme napr. 50 ml/min.). Za týchto podmienok by sa žubrienky mali vyvinúť zo štádií 45/46 do štádia 51 do 12 dní. Reprezentatívne žubrienky z tejto zásobnej populácie by sa mali každý deň kontrolovať z hľadiska vývinového štádia s cieľom odhadnúť vhodný časový bod na začatie expozície. Pozornosť by sa mala venovať minimalizovaniu stresu a traumy žubrienok, a to najmä počas presunov, čistenia akvárií a manipulácie s larvami. Je potrebné vyhýbať sa stresujúcim podmienkam/činnostiam, ako je silný a/alebo nepretržitý hluk, búchanie na akváriá, vibrácie v akváriách, nadmerná činnosť v laboratóriu a náhle zmeny okolitého prostredia (dostupnosti svetla, teploty, pH, rozpusteného kyslíka, prietoku vody atď.). Ak vývin žubrienok nepokročí do štádia 51 do 17 dní od oplodnenia, za potenciálnu príčinu možno považovať nadmerný stres.

Kultivácia a kŕmenie lariev

13. Žubrienky sa počas celého obdobia pred expozíciou [po Nieuwkoopovej a Faberovej (NF) fáze 45/46 (8)] a počas celého testovacieho obdobia 21 dní kŕmia napríklad komerčným krmivom pre žubrienky používaným vo validačných štúdiách (pozri tiež dodatok 1) alebo inou potravou, použitím ktorej sa preukazne dosahujú rovnaké výsledky v skúške metamorfózy obojživelníkov. Kŕmny režim počas obdobia pred expozíciou sa musí starostlivo upraviť tak, aby zodpovedal požiadavkám vyvíjajúcich sa žubrienok. To znamená, že čerstvo vyliahnutým žubrienkam by sa niekoľkokrát denne (aspoň dvakrát) mali podávať malé dávky potravy. Nemá sa podávať nadmerné množstvo potravy, aby sa *i)* zachovala kvalita vody a *ii)* zabránilo upchatiu žiabrových filtrov časticami a zvyškami potravy. V prípade krmiva pre žubrienky použitého vo validačných štúdiách by sa denný prídel potravy mal zvyšovať spolu s rastom žubrienky na približne 30 mg/živočích/deň krátko pred začatím testu. Vo validačných štúdiách sa preukázalo, že toto komerčne dostupné krmivo podporuje správny rast a vývin žubrienok *X. laevis*. Skladá sa z jemných častíc, ktoré zostanú dlho suspendované vo vodnom stĺpci a odstraňujú sa prúdom vody. Preto by sa celkové denné množstvo potravy malo rozdeliť na menšie dávky a podávať aspoň dvakrát denne. Kŕmny režim pre toto krmivo je uvedený v tabuľke 1. Dávky krmiva by sa mali zaznamenávať. Môže sa podávať suché alebo ako zásobný roztok pripravený v riediacej vode. Tento zásobný roztok sa má čerstvo pripravovať každý druhý deň a, keď sa nepoužíva, má sa skladovať pri teplote 4 C.

Tabuľka 1

Kŕmny režim pre komerčne dostupné krmivo pre žubrienky použité vo validačných štúdiách so žubrienkami *X. laevis* počas časti skúšky AMA so živými živočíchmi v podmienkach prietoku

Deň štúdie	Prídel potravy (mg krmiva/živočích/deň)
0. – 4.	30
5. – 7.	40
8. – 10.	50
11. – 14.	70
15. – 21.	80

Analytická chémia

14. Pred vykonaním štúdie by sa mala vyhodnotiť stabilita testovanej chemikálie s využitím dostupných informácií o jej rozpustnosti, degradovateľnosti a prchavosti. Z testovacích roztokov zo všetkých nádrží s replikátom pre každú koncentráciu by sa mali odobrať vzorky na analytické chemické analýzy na začiatku testu (0. deň) a každý týždeň počas testu, spolu minimálne štyri vzorky. Takisto sa odporúča, aby sa každá testovaná koncentrácia analyzovala aj počas prípravy systému pred začiatkom testu na overenie výkonnosti systému. Okrem toho sa odporúča, aby sa analyzovali aj zásobné roztoky, keď sa menia, najmä ak objem zásobného roztoku neposkytuje dostatočné množstvo chemikálie na analýzy počas celého bežného obdobia odberu vzoriek. V prípade chemikálií, ktoré nemožno zistiť pri niektorých alebo všetkých koncentráciách použitých v teste, by sa mali odmerať zásobné roztoky a mali by sa zaznamenať prietoky systému, aby bolo možné vypočítať nominálne koncentrácie.

Aplikovanie chemikálie

15. Metódy používané na aplikovanie testovanej chemikálie do systému sa môžu líšiť v závislosti od jej fyzikálno-chemických vlastností. Chemikálie rozpustné vo vode možno rozpustiť v alikvotných častiach testovacej vody v koncentrácii, ktorá umožňuje aplikovanie pri cieľovej testovanej koncentrácii v prietokovom systéme. Chemikálie, ktoré sú kvapalné pri izbovej teplote a slabo rozpustné vo vode, možno aplikovať pomocou metód saturátora kvapalina: kvapalina. Chemikálie, ktoré sú pevné pri izbovej teplote a slabo rozpustné vo vode, možno aplikovať pomocou saturačných kolón so sklenou vatou (7). Odporúča sa použiť testovací systém bez nosiča. Rôzne testované chemikálie však budú mať odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti, ktoré si pravdepodobne budú vyžadovať rôzne prístupy k príprave vody na expozíciu chemikálii. Odporúča sa urobiť všetko pre to, aby nebolo nutné použiť rozpúšťadlá alebo nosiče, pretože: *i)* niektoré rozpúšťadlá samotné môžu mať za následok toxicitu a/alebo nežiaduce alebo neočakávané endokrinologické odozvy, *ii)* testované chemikálie vo vyššom množstve ako ich rozpustnosť vo vode (k čomu často dochádza pri použití rozpúšťadiel) môžu viesť k nepresnému stanoveniu účinných koncentrácií a *iii)* použitie rozpúšťadiel v dlhodobých testoch môže mať za následok tvorbu značného ‚biofilmu' spojeného s mikrobiálnou aktivitou. V prípade ťažko testovateľných chemikálií možno rozpúšťadlo použiť ako poslednú možnosť, pričom na stanovenie najlepšej metódy je potrebné prečítať si usmerňovací dokument OECD o testovaní vodnej toxicity ťažkých látok a zmesí (4). Výber rozpúšťadla sa stanoví na základe chemických vlastností chemikálie. Medzi rozpúšťadlá, ktoré sa považujú za účinné na testovanie vodnej toxicity, patrí acetón, etanol, metanol, dimetylformamid a trietylénglykol. V prípade použitia rozpúšťadla ako nosiča by koncentrácie rozpúšťadla mali byť nižšie ako chronická koncentrácia, pri ktorej sa nepozorujú účinky (NOEC). V usmerňovacom dokumente OECD sa odporúča maximálne 100 µl/l, pričom v nedávnom preskúmaní sa odporúča použiť koncentráciu rozpúšťadla len 20 µl/l riediacej vody (12). Ak sa používajú rozpúšťadlá ako nosiče, okrem kontrolných skupín bez rozpúšťadla by sa mali vyhodnotiť aj vhodné kontrolné skupiny s rozpúšťadlom (čistá voda). Ak nie je možné aplikovať chemikáliu prostredníctvom vody z dôvodu fyzikálno-chemických vlastností (nízkej rozpustnosti) alebo obmedzenej chemickej dostupnosti, možno uvažovať o jej aplikovaní v potrave. Uskutočnil sa predbežný výskum expozície v prípade aplikovania v potrave, ale tento spôsob expozície sa bežne nepoužíva. Výber metódy by sa mal zdokumentovať a analyticky overiť.

Výber testovaných koncentrácií

Stanovenie vysokej testovanej koncentrácie

16. Na účely tohto testu sa vysoká testovaná koncentrácia má stanoviť podľa limitu rozpustnosti testovanej chemikálie, maximálnej tolerovanej koncentrácie (MTC) pre akútne toxické chemikálie alebo na 100 mg/l, podľa toho, ktorá hodnota je najnižšia.

17. MTC sa vymedzuje ako najvyššia testovaná koncentrácia chemikálie, ktorá vedie k menšej ako 10 % akútnej úmrtnosti. Tento prístup predpokladá, že existujú empirické údaje o akútnej úmrtnosti, na základe ktorých možno odhadnúť MTC. Odhad MTC môže byť nepresný a zvyčajne si vyžaduje určitý odborný posudok. Hoci používanie regresných modelov môže byť z technického hľadiska najvhodnejším prístupom k odhadu MTC, užitočnú aproximáciu MTC možno odvodiť aj z existujúcich údajov o akútnej toxicite ako 1/3 hodnoty akútnej LC_{50}. Údaje o akútnej toxicite testovacieho druhu však nemusia byť k dispozícii. Ak údaje o akútnej toxicite konkrétneho druhu nie sú k dispozícii, možno uskutočniť 96-hodinový test LC_{50} so žubrienkami, ktoré sú reprezentatívne (t. j. v rovnakom štádiu) pre žubrienky testované v skúške AMA. Prípadne ak sú k dispozícii údaje o iných vodných druhoch (napr. štúdie LC_{50} pri rybách alebo iných druhoch obojživelníkov), možno na základe odborného posudku odhadnúť pravdepodobnú hodnotu MTC pomocou medzidruhovej extrapolácie.

18. Alternatívne ak chemikália nie je akútne toxická a je rozpustná pri koncentrácii nad 100 mg/l, potom sa za najvyššiu testovanú koncentráciu (HTC) má považovať 100 mg/l, pretože táto koncentrácia sa zvyčajne považuje za ‚prakticky netoxickú'.

19. Hoci statické obnovovacie metódy nie sú odporúčaným postupom, môžu sa použiť, keď prietokové metódy nie sú dostatočné na dosiahnutie MTC. Ak sa použijú statické obnovovacie metódy, je potrebné zdokumentovať stabilitu koncentrácie testovanej chemikálie, ktorá by mala zostať v rámci hraníc kritérií účinnosti. Odporúčajú sa 24-hodinové obdobia obnovovania. Obdobia obnovovania dlhšie ako 72 hodín nie sú prijateľné. Okrem toho sa na konci každého obdobia obnovovania bezprostredne pred obnovením majú odmerať parametre kvality vody (napr. rozpustný kyslík, teplota, pH atď.).

Rozsah testovanej koncentrácie

20. Požadované *minimum* predstavujú tri testované koncentrácie a kontrolná skupina s čistou vodou (a kontrolná skupina, ktorej bolo aplikované vehikulum, ak to je potrebné). Minimálny rozdiel medzi najvyššou a najnižšou testovanou koncentráciou by mal byť približne jedna rádová hodnota. Maximálny rozstup medzi dávkami je 0,1 a minimálny 0,33.

POSTUP

Začiatok a vykonanie testu

0. deň

21. Expozícia by sa mala začať vtedy, keď dostatočný počet žubrienok z predexpozičnej zásobnej populácie dosiahne vývinové štádium 51 podľa Nieuwkoopa a Fabera (8), pričom musia mať vek 17 dní alebo menej od oplodnenia. Na účely výberu testovacích živočíchov sa zdravé a normálne vyzerajúce žubrienky zo zásobnej populácie majú spoločne vložiť do jednej nádoby s vhodným objemom riediacej vody. Na stanovenie vývinového štádia sa žubrienky majú po jednej vyberať zo spoločnej nádrže pomocou malej siete alebo cedidla a preniesť do priehľadnej meracej komory (napr. 100 mm Petriho misky) s riediacou vodou. Pri stanovovaní štádia nie je vhodné použiť anestéziu, individuálne však možno žubrienky pred manipuláciou uspať s použitím 100 mg/l trikaín metánsulfonátu (napr. MS-222) vhodne tlmeného hydrogénuhličitanom sodným (pH 7,0). Ak sa použije, metodika správneho použitia napr. MS-222 na anestéziu sa má získať od skúsených laboratórií a uviesť v správe spolu s výsledkami testu. So živočíchmi sa počas tohto prenosu musí manipulovať opatrne, aby sa minimalizoval stres pri manipulácii a aby nedošlo k poraneniu.

22. Vývinové štádium živočíchov sa stanovuje pomocou binokulárneho disekčného mikroskopu. V záujme zníženia základnej variability vo vývinovom štádiu je dôležité, aby sa toto stanovenie vykonalo čo najpresnejšie. Podľa Nieuwkoopa a Fabera (8) je hlavným vývinovým znakom pri výbere organizmov v štádiu 51 morfológia zadných končatín. Morfologické vlastnosti zadných končatín by sa mali preskúmať pod mikroskopom. Kým na získanie komplexných informácií o stanovovaní štádií žubrienok je nutné prečítať si celé usmernenie od Nieuwkoopa a Fabera (8), vývinové štádium možno spoľahlivo určiť aj pomocou nápadných morfologických znakov. Nasledujúcu tabuľku možno použiť na zjednodušenie a štandardizovanie procesu stanovovania štádia v priebehu štúdie prostredníctvom identifikovania nápadných morfologických znakov spojených s rôznymi štádiami za predpokladu, že vývin je normálny.

Tabuľka 2

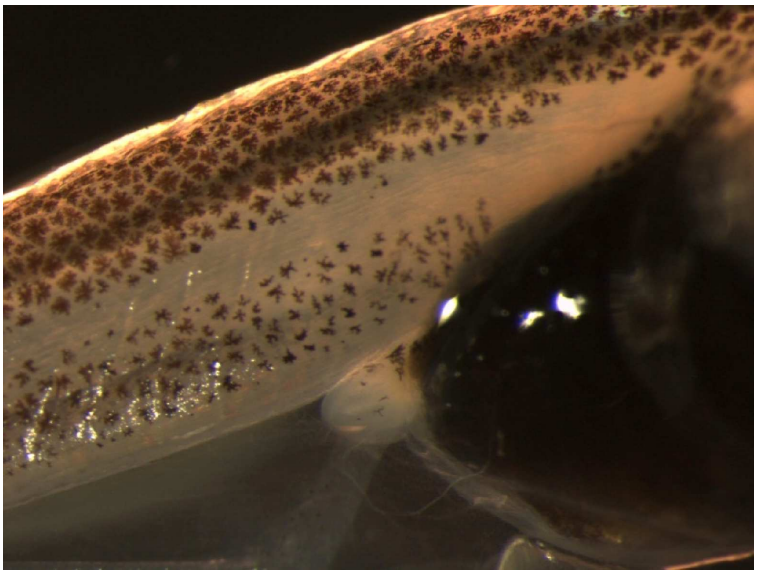
Nápadné morfologické znaky jednotlivých štádií podľa usmernenia Nieuwkoopa a Fabera

Nápadné morfologické znaky	Vývinové štádium															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Zadné končatiny	X	X	X	X	X	X	X									
Predné končatiny						X	X	X	X	X						
Kraniofaciálna štruktúra										X	X	X	X			
Morfológia čuchového nervu											X	X	X			
Dĺžka chvosta													X	X	X	X

23. Na to, aby bolo možné začať test, musia byť všetky žubrienky v štádiu 51. Najnápadnejší morfologický znak tohto štádia je morfológia zadných končatín, čo potvrdzuje obrázok 1.

Obrázok 1

Morfológia zadných končatín žubrienky *X. laevis* v štádiu 51



24. Okrem výberu pokusných živočíchov podľa vývinového štádia možno voliteľne použiť aj výber podľa veľkosti. Na tieto účely je potrebné odmerať dĺžku celého tela (nie SVL) v 0. deň na podvzorke približne 20 žubrienok v štádiu 51 podľa NF. Po výpočte priemernej dĺžky celého tela tejto skupiny živočíchov možno stanoviť minimálne a maximálne hranice pre dĺžku celého tela pokusných živočíchov s rozsahom priemernej hodnoty ± 3 mm (priemeru hodnôt dĺžky celého tela je v rozsahu 24,0 – 28,1 mm pre žubrienky v štádiu 51). Primárnym parametrom na stanovenie pripravenosti každého testovaného živočícha je však stanovenie vývinového štádia. Žubrienky s výrazne viditeľnými malformáciami alebo poraneniami by sa mali zo skúšky vylúčiť.

25. Žubrienky, ktoré spĺňajú uvedené kritériá štádia, sa držia v nádrži s čistou kultivačnou vodou až do skončenia procesu stanovovania štádia. Po stanovení štádia sa larvy náhodne rozdelia do expozičných testovacích nádrží tak, aby každá nádrž obsahovala 20 lariev. Živočíchy v každej testovacej nádrži sa potom skontrolujú, či nemajú abnormálny vzhľad (napr. poranenia abnormálne plávanie atď.). Zjavne nezdravo vyzerajúce žubrienky sa majú z testovacích nádrží odstrániť a nahradiť novými larvami zo spoločnej nádrže.

Pozorovania

26. Podrobnejšie informácie o postupoch ukončenia testu a spracovaní žubrienok sa nachádzajú v usmerňovacom dokumente OECD o histológii štítnej žľazy obojživelníkov (9).

Merania v 7. deň

27. V 7. deň sa z každej testovacej nádrže vyberie päť náhodne vybratých žubrienok na replikát. Musí sa použiť taký náhodný postup, aby mal každý testovaný organizmus rovnakú pravdepodobnosť, že bude vybratý. To možno dosiahnuť použitím akejkoľvek randomizačnej metódy, ale vyžaduje sa, aby sa každá žubrienka vybrala sieťkou. Žubrienky, ktoré neboli vybraté, sa vrátia do pôvodnej nádrže a vybraté žubrienky sa humánnym spôsobom usmrtia v 150 – 200 mg/l príslušnej látky, napr. MS-222, primerane tlmenej hydrogénuhličitanom sodným na pH 7,0. Usmrtené žubrienky sa opláchnu vodou a osušia. Následne sa odmeria ich telesná hmotnosť s presnosťou na miligram. Každej žubrienke sa odmeria dĺžka zadných končatín, dĺžka od pysku po kloaku a stanoví sa vývinové štádium (pomocou binokulárneho disekčného mikroskopu).

Merania v 21. deň (ukončenie testu)

28. V deň ukončenia testu (21. deň) sa zostávajúce žubrienky vyberú z testovacích nádrží a humánne usmrtia v 150 – 200 mg/l príslušnej látky, napr. MS-222, primerane tlmenej hydrogénuhličitanom sodným, ako je opísané vyššie. Žubrienky sa opláchnu vodou a osušia. Následne sa odmeria ich telesná hmotnosť s presnosťou na miligram. Pre každú žubrienku sa stanoví vývinové štádium a odmeria SVL a dĺžka zadných končatín.

29. Všetky larvy sa na 48 – 72 hodín umiestnia do Davidsonovho fixačného prostriedku buď ako vzorky celého tela alebo ako narezané vzorky tkaniva hlavy obsahujúce dolnú čeľusť na účely histologických vyšetrení. Na účely histopatologického vyšetrenia sa z každej nádrže s replikátom odoberie vzorka piatich žubrienok. Keďže výška folikulárnych buniek závisí od štádia (10), najvhodnejším prístupom k odberu vzoriek na histologické analýzy je použitie jedincov v rovnakom štádiu, pokiaľ to je možné. Na účely výberu jedincov v rovnakom štádiu sa má pred výberom a následným spracovaním na účely získania údajov a zakonzervovania stanoviť štádium všetkých lariev. To je potrebné preto, lebo normálne rozdiely vo vývine budú viesť k rozdielnej distribúcii štádií v jednotlivých nádržiach s replikátom.

30. Živočíchy vybraté na histopatologické vyšetrenie (n = 5 z každého replikátu) by mali zodpovedať mediánovému štádiu kontrolných živočíchov (spojených replikátov), pokiaľ to je možné. Ak je v niektorých nádržiach s replikátom viac ako päť lariev vo vhodnom štádiu, náhodne sa vyberie päť lariev.

31. Ak je v niektorých nádržiach s replikátom menej ako päť lariev vo vhodnom štádiu, náhodne sa vyberú jedince z nasledujúceho nižšieho alebo vyššieho vývinového štádia tak, aby sa dosiahla celková veľkosť vzorky päť lariev na replikát. Rozhodnutie o použití doplnkových lariev z nasledujúceho nižšieho alebo vyššieho vývinového štádia by podľa možnosti malo byť založené na celkovom vyhodnotení distribúcie štádií v kontrolnej skupine a skupinách s aplikovanou chemikáliou. To znamená, že ak je aplikovanie chemikálie spojené s oneskorením vývinu, doplnkové larvy by sa mali odobrať z nasledujúceho nižšieho štádia. Naopak ak je aplikovanie chemikálie spojené s urýchlením vývinu, doplnkové larvy by sa mali odobrať z nasledujúceho vyššieho štádia.

32. V prípade závažných zmien vo vývine žubrienok v dôsledku aplikovania testovanej chemikálie sa môže stať, že distribúcia štádií v skupine s aplikovanou chemikáliou sa nebude prekrývať s vypočítaným mediánovým vývinovým štádiom v kontrolnej skupine. Len v týchto prípadoch sa má výberový proces upraviť tak, že sa použije štádium odlišné od mediánového štádia v kontrolnej skupine, aby bolo možné vykonať histopatologické vyšetrenie štítnej žľazy s použitím vzoriek v rovnakom štádiu. Okrem toho ak štádiá nemožno určiť (t. j. asynchrónia), na histologickú analýzu sa náhodne vyberie päť žubrienok z každého replikátu. Vždy je nutné uviesť odôvodnenie výberu vzoriek lariev, ktoré nie sú v štádiu zodpovedajúcom mediánovému vývinovému štádiu kontrolnej skupiny.

Stanovenie biologických sledovaných parametrov

33. Počas 21-dňovej expozičnej fázy sa meranie základných sledovaných parametrov vykonáva v 7. a 21. deň, testované živočíchy sa však musia pozorovať každý deň. Tabuľka 3 obsahuje prehľad sledovaných parametrov merania a príslušné časové body pozorovania. Podrobnejšie informácie o technických postupoch merania vrcholových sledovaných parametrov a histologických hodnotení sa nachádzajú v usmerňovacích dokumentoch OECD (9).

Tabuľka 3

Časové body pozorovania pre základné sledované parametre skúšky AMA

Vrcholové sledované parametre	denne	7. deň	21. deň
— úmrtnosť	•		
— vývinové štádium		•	•
— dĺžka zadných končatín		•	•
— dĺžka od pysku po kloaku		•	•
— mokrá telesná hmotnosť		•	•
— histológia štítnej žľazy			•

Vrcholové sledované parametre

34. Vrcholové sledované parametre skúšky AMA sú vývinové štádium, dĺžka zadných končatín, SVL a mokrá hmotnosť. Každý z nich je stručne opísaný ďalej. Ďalšie technické informácie o zbere týchto údajov vrátane odporúčaných postupov počítačovej analýzy sú k dispozícii v uvedených usmerňovacích dokumentoch.

Vývinové štádium

35. Vývinové štádium žubrienok *X. laevis* sa stanovuje pomocou kritérií stanovenia štádia podľa Nieuwkoopa a Fabera (8). Údaje o vývinovom štádiu slúžia na určenie toho, či je vývin urýchlený asynchrónny, oneskorený alebo nedotknutý. Urýchlenie alebo oneskorenie vývinu sa určuje porovnaním mediánového štádia dosiahnutého v kontrolnej a testovanej skupine. Asynchrónny vývin sa uvádza vtedy, keď skúmané tkanivá nie sú malformované ani abnormálne, ale keď je pri konkrétnej žubrienke narušené relatívne načasovanie morfogenézy alebo vývinu rôznych tkanív.

Dĺžka zadných končatín

36. Diferenciáciu a rast zadných končatín, ktoré sú hlavnými vývinovými znakmi už použitými na stanovenie vývinového štádia, regulujú hormóny štítnej žľazy. Vývin zadných končatín sa používa kvalitatívne na stanovenie vývinového štádia, ale tu sa považuje za kvantitatívny sledovaný parameter. Dĺžka zadných končatín sa preto meria ako sledovaný parameter na zistenie účinkov na os štítnej žľazy (obrázok 2). V záujme jednotnosti sa dĺžka zadných končatín meria na ľavej zadnej končatine. Dĺžka zadných končatín sa vyhodnotí v 7. deň aj 21. deň testu. V 7. deň je meranie dĺžky zadnej končatiny jednoduché ako to vidieť na obrázku 2. V 21. deň je to už zložitejšie z dôvodu ohybov končatiny. Merania dĺžky zadných končatín v 21. deň by preto mali začínať od steny tela a sledovať stredovú čiaru končatiny cez prípadné uhlové odchýlky. Zmeny v dĺžke zadných končatín v 7. deň aj keď nie sú zrejmé v 21. deň, sa stále považujú za významné z hľadiska potenciálneho pôsobenia na štítnu žľazu. Merania dĺžky sa získavajú z digitálnych fotografií pomocou softvéru na analýzu obrazu ako sa uvádza v usmerňovacom dokumente OECD o histológii štítnej žľazy obojživelníkov (9).

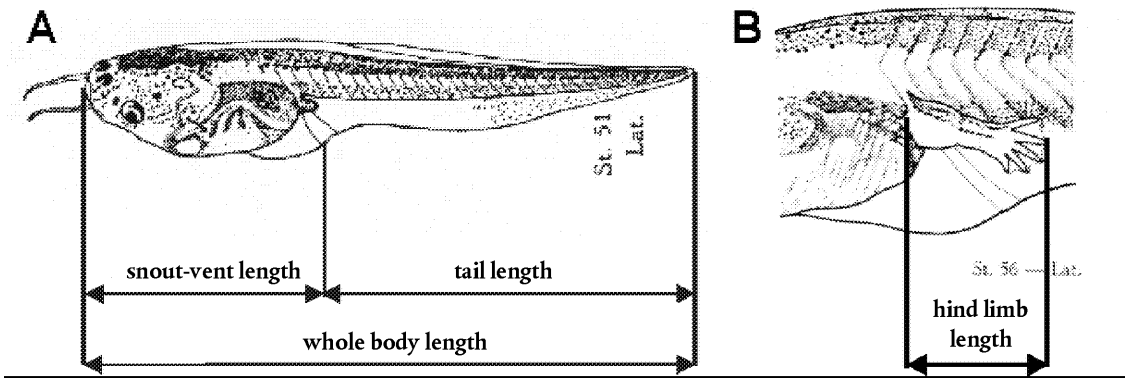
Dĺžka tela a mokrá hmotnosť

37. Spôsoby stanovenia dĺžky od pysku po kloaku (SVL) (obrázok 2) a mokrej hmotnosti sú uvedené v protokole testu na posúdenie možných účinkov testovaných chemikálií na rýchlosť rastu žubrienok v porovnaní s kontrolnou skupinou a sú užitočné pri detekcii celkovej toxicity na testovanú chemikáliu. Keďže odstránenie priľnutej vody na účely stanovenia hmotnosti môže žubrienke spôsobiť stres a poškodenie kože, tieto merania sa vykonávajú na žubrienkach odobratých ako podvzorky v 7. deň a na všetkých ostatných žubrienkach po ukončení testu (21. deň). V záujme jednotnosti použite kraniálny okraj kloaky ako kaudálny limit merania.

38. Dĺžka od pysku po kloaku (SVL) sa používa na posúdenie rastu žubrienky, ako je znázornené na obrázku 2.

Obrázok 2

(A) Druhy meraní dĺžky tela a (B) meranie dĺžky zadných končatín žubrienok *X. laevis* (1).



Histológia štítnej žľazy

39. Zatiaľ čo vývinové štádium a dĺžka zadných končatín sú významné sledované parametre na hodnotenie zmien vo vývoji metamorfózy súvisiacich s expozíciou, oneskorený vývin sa sám osebe nemôže považovať za diagnostický ukazovateľ pôsobenia proti štítnej žľaze. Niektoré zmeny možno zistiť len bežnou histopatologickou analýzou. Diagnostické kritériá zahŕňajú hypertrofiu/atrofiu štítnej žľazy, hypertrofiu folikulárnych buniek, hyperpláziu folikulárnych buniek a ďalšie kvalitatívne kritériá: plochu folikulárnej dutiny, kvalitu koloidu a výšku/tvar folikulárnych buniek. Je potrebné uviesť stupeň závažnosti (štyri stupne). Informácie o získaní a spracovaní vzoriek na histologickú analýzu a o vykonávaní histologickej analýzy vzoriek tkaniva sú k dispozícii v dokumentoch ‚Skúška metamorfózy obojživelníkov: časť 1 – Technické usmernenia na odber morfologických vzoriek a histologickú prípravu' a ‚Skúška metamorfózy obojživelníkov: časť 2 – Prístup k čítaniu štúdií, diagnostických kritérií, stupňov závažnosti a atlasu' (9). Laboratóriá, ktoré vykonávajú skúšku prvýkrát, by pred uskutočnením histologickej analýzy a vyhodnotením štítnej žľazy mali požiadať o radu skúsených patológov na účely zaškolenia. V prípade zreteľných a podstatných zmien vo vrcholových sledovaných parametroch, ktoré nasvedčujú urýchlenému alebo asynchrónnemu vývinu, nemusí byť nutné vykonať histopatologickú analýzu štítnej žľazy. Ak však zreteľné morfologické zmeny alebo dôkazy o oneskorení vývinu neexistujú, histologické analýzy sú potrebné.

Úmrtnosť

40. Všetky testovacie nádrže sa musia každý deň kontrolovať, či v nich nie sú mŕtve žubrienky. Ak sú, ich počet v každej nádrži sa musí zaznamenať. Pre každý úhyn je potrebné zaznamenať dátum, koncentráciu a číslo nádrže. Mŕtve živočíchy sa musia z nádrže odstrániť ihneď po zistení úhynu. Úmrtnosť presahujúca 10 % môže znamenať nevhodné testovacie podmienky alebo toxické účinky testovanej chemikálie.

Ďalšie pozorovania

41. Je nutné zaznamenať prípady abnormálneho správania a zreteľne viditeľných malformácií a lézií. Pre každé abnormálne správanie, zreteľnú malformáciu alebo léziu je potrebné zaznamenať dátum, koncentráciu a číslo nádrže. Normálne správanie sa vyznačuje rozptýlením žubrienok vo vodnom stĺpci s chvostom vztýčeným nad hlavou, pravidelným rytmickým búchaním chvostovou plutvou, pravidelným vychádzaním na hladinu, vytvorením žiabrových viečok a reagovaním na podnety. Abnormálne správanie zahŕňa napríklad plávanie na povrchu, ležanie na spodku nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu a nereagovanie na podnety. Okrem toho je nutné zaznamenať aj výrazné rozdiely v konzumácii potravy medzi vzorkami s aplikovanou chemikáliou. Zreteľné malformácie a lézie môžu okrem iného zahŕňať morfologické abnormality (napr. deformácie končatín), krvavé lézie, bakteriálne alebo plesňové infekcie. Tieto stanovenia sú kvalitatívne a mali by sa považovať za podobné klinickým príznakom ochorenia/stresu a porovnať s kontrolnými živočíchmi. Ak je výskyt alebo miera výskytu v exponovaných nádržiach vyššia ako v kontrolných nádržiach, malo by sa to považovať za dôkaz zjavnej toxicity.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Zber údajov

42. Všetky údaje by sa mali zbierať pomocou elektronických alebo manuálnych systémov, ktoré sú v súlade so správnou laboratórnou praxou (SLP). Údaje zo štúdie by mali zahŕňať:

Testovaná chemikália:

— charakterizácia testovanej chemikálie: fyzikálno-chemické vlastnosti, údaje o stálosti a biodegradovateľnosti,

— chemické informácie a údaje: spôsob a frekvencia prípravy roztokov. Informácie o testovanej chemikálii zahŕňajú skutočné a nominálne koncentrácie testovanej chemikálie a v niektorých prípadoch podľa potreby nepôvodnej chemikálie. Merania testovanej chemikálie sa môžu vyžadovať pre zásobné roztoky i testované roztoky,

— rozpúšťadlo (ak je iné ako voda): odôvodnenie výberu rozpúšťadla a charakterizáciu rozpúšťadla (druh, použitá koncentrácia).

Podmienky testu:

— prevádzkové záznamy: skladajú sa z pozorovaní týkajúcich sa fungovania testovacieho systému a podporného prostredia a infraštruktúry. Typické záznamy zahŕňajú: teplotu okolia, testovaciu teplotu, fotoperiódu, stav kritických prvkov expozičného systému (napr. čerpadiel, počítadiel cyklov, tlakov), prietoky, hladiny vody, zmeny v zásobnej fľaši a záznamy o kŕmení. Všeobecné parametre kvality vody zahŕňajú: pH, rozpustený kyslík, vodivosť, celkový jód, zásaditosť a tvrdosť,

— odchýlky od testovacej metódy: táto informácia by mala zahŕňať všetky informácie o odchýlkach od testovacej metódy alebo ich slovné opisy.

Výsledky:

— biologické pozorovania a údaje: patria sem každodenné pozorovania úmrtnosti, spotreby potravy abnormálneho plávania, letargie, straty rovnováhy, malformácií, lézií atď. Pozorovania a údaje zozbierané vo vopred určených intervaloch zahŕňajú: vývinové štádium, dĺžku zadných končatín, dĺžku od pysku po kloaku a mokrú hmotnosť,

— štatistické analytické metódy a odôvodnenie použitých metód, výsledky štatistickej analýzy, najlepšie v tabuľkovej forme,

— histologické údaje: zahŕňajú slovné opisy ako aj stupeň závažnosti a skóre výskytu osobitných pozorovaní v súlade s usmerňovacím dokumentom o histopatológii,

— pozorovania *ad hoc*: tieto pozorovania by mali zahŕňať slovné opisy štúdie, ktoré nepatria do uvedených kategórií.

Oznamovanie údajov

43. Dodatok 2 obsahuje hárky na každodenné zaznamenávanie získaných údajov, ktoré možno použiť ako usmernenie na zapisovanie nespracovaných údajov a výpočty súhrnných štatistík. Okrem toho sú k dispozícii oznamovacie tabuľky vhodné na sprostredkovanie zhrnutí údajov o sledovaných parametroch. Oznamovacie tabuľky pre histologické hodnotenia sa nachádzajú v dodatku 2.

Kritériá účinnosti a test prípustnosti/validity

44. Výrazné odchýlky od testovacej metódy budú mať vo všeobecnosti za následok neprijateľné údaje na účely interpretácie alebo podávania správ. Preto sa vypracovali kritériá uvedené v tabuľke 4 ako usmernenie na určenie kvality vykonaného testu, teda všeobecného stavu kontrolných organizmov.

Tabuľka 4

Kritériá účinnosti pre skúšku AMA

Kritérium	Prípustné limity
Testované koncentrácie	Udržiavané na úrovni ≤ 20 % CV (variabilita nameranej testovanej koncentrácie) počas 21-dňového testu.
Úmrtnosť v kontrolných skupinách	≤ 10 % – úmrtnosť v každom jednom replikáte v kontrolných skupinách by nemala prekročiť dve žubrienky.
Minimálne mediánové vývinové štádium kontrolných organizmov na konci testu	57
Rozptyl vývinových štádií v kontrolnej skupine	10. a 90. percentil distribúcie vývinových štádií by sa nemal líšiť o viac ako štyri štádiá.
Rozpustený kyslík	≥ 40 % rozpustnosť vzdušného kyslíka (*)

Kritérium	Prípustné limity
pH	pH by sa malo udržiavať v rozmedzí 6,5 – 8,5. Rozdiely medzi replikátmi/koncentráciami chemikálie by nemali byť väčšie ako 0,5.
Teplota vody	22° ± 1 °C – rozdiely medzi replikátmi/koncentráciami chemikálie by nemali byť väčšie ako 0,5 °C.
Testované koncentrácie bez zjavnej toxicity	≥ 2
Stav replikátov	≤ 2 replikáty v rámci testu môžu byť narušené.
Osobitné podmienky na použitie rozpúšťadla	Ak sa použije rozpúšťadlo ako nosič, je nutné použiť kontrolnú skupinu s rozpúšťadlom i kontrolnú skupinu s čistou vodou a uviesť výsledky.
	Štatisticky významné rozdiely medzi kontrolnými skupinami s rozpúšťadlom a kontrolnými skupinami s vodou treba riešiť osobitne. Viac informácií sa nachádza ďalej.
Osobitné podmienky pre statický obnovovací systém	V správe je potrebné uviesť reprezentatívne chemické analýzy vykonané pred obnovením a po ňom.
	Bezprostredne pred obnovením sa musí odmerať hladina amoniaku.
	Bezprostredne pred obnovením sa musia odmerať všetky parametre kvality vody uvedené v tabuľke 1 dodatku 1.
	Obdobie obnovenia by nemalo presiahnuť 72 hodín.
	Vhodný harmonogram kŕmenia (50 % denného prídelu komerčného krmiva pre žubrienky).

(*) Prevzdušňovanie vody možno zabezpečiť pomocou premývačiek. Odporúča sa nastaviť premývačky na úrovne, ktoré žubrienkam nespôsobujú neprimeraný stres.

Validita testu

45. Tieto požiadavky by sa mali splniť na to, aby sa test mohol považovať za prípustný/platný:

Platný pokus pre test stanovený ako negatívny na pôsobenie na štítnu žľazu:

1. Pre každé aplikovanie chemikálie (vrátane kontrolných skupín) nesmie úmrtnosť presiahnuť 10 %. Pre každý replikát nesmie úmrtnosť presiahnuť tri žubrienky, inak sa replikát považuje za narušený.

2. Na analýzu musia byť k dispozícii aspoň dve úrovne koncentrácie chemikálie so všetkými štyrmi nenarušenými replikátmi.

3. Na analýzu musia byť k dispozícii aspoň dve úrovne koncentrácie chemikálie bez zjavnej toxicity.

Platný pokus pre test stanovený ako pozitívny na pôsobenie na štítnu žľazu:

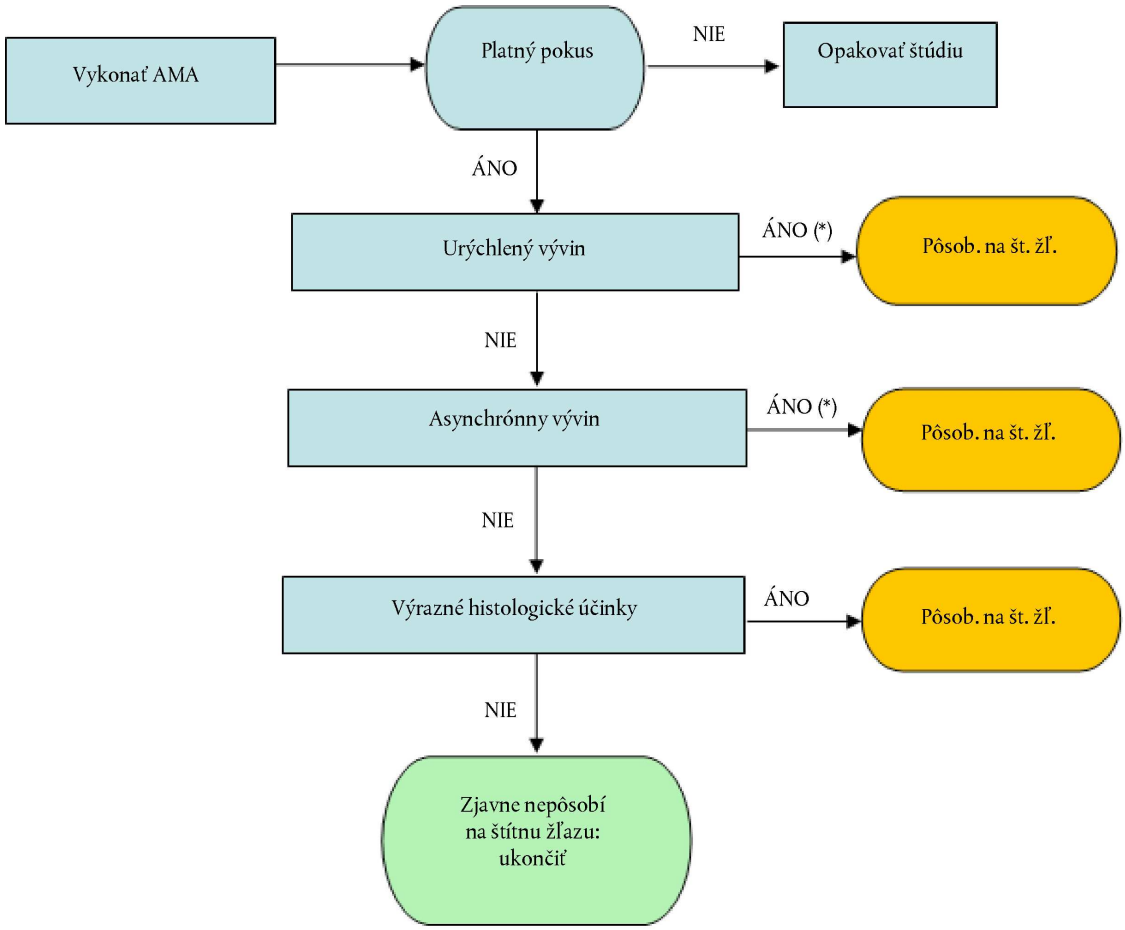
1. Môže sa vyskytnúť úmrtnosť nie viac ako dve žubrienky/replikát v kontrolnej skupine.

Logická schéma rozhodovania pri vykonávaní skúšky AMA

46. Pre skúšku AMA sa vytvorila logická schéma rozhodovania ako logická pomôcka pri vykonávaní biologickej skúšky a interpretácii jej výsledkov (pozri vývojový diagram na obrázku 3). Podľa tejto logickej schémy rozhodovania sa v podstate vážia sledované parametre tak, že urýchlený vývin asynchrónny vývin a histopatológia štítnej žľazy majú veľkú váhu, kým oneskorený vývin, dĺžka od pysku po kloaku a mokrá telesná hmotnosť, teda parametre, ktoré môžu byť potenciálne ovplyvnené všeobecnou toxicitou, majú menšiu váhu.

Obrázok 3

Logická schéma rozhodovania pri vykonávaní skúšky AMA



(*) Niektoré regulačné orgány môžu vyžadovať histologické vyšetrenie napriek výrazným rozdielom v urýchlenom a asynchrónnom vývine. Subjektu vykonávajúcemu tento test sa odporúča, aby sa pred vykonaním testu poradil s príslušnými orgánmi o tom, ktoré sledované parametre sú povinné.

Urýchlený vývin (stanovený podľa vývinovej fázy, SVL a HLL)

47. Je známe, že urýchlený vývin sa vyskytuje len prostredníctvom účinkov, ktoré súvisia s hormónom štítnej žľazy. Môže ísť o účinky na periférne tkanivá, ako je priama interakcia s receptorom hormónu štítnej žľazy (napr. T4) alebo účinky, ktoré menia hladinu hormónu štítnej žľazy v krvnom obehu. V obidvoch prípadoch sa to považuje za dostatočný dôkaz pôsobenia chemikálie na štítnu žľazu. Urýchlený vývin sa vyhodnocuje jedným z dvoch spôsobov. Po prvé, všeobecné vývinové štádium možno vyhodnotiť s použitím štandardizovaného prístupu podľa Nieuwkoopa a Fabera (8). Po druhé, v 7. aj 21. dni možno kvantifikovať konkrétne morfologické znaky, napríklad dĺžku zadných končatín, ktoré jasne súvisia s agonistickými účinkami na receptor hormónu štítnej žľazy. Ak sa zistí štatisticky významný urýchlený vývin alebo väčšia dĺžka zadných končatín, potom z testu vyplýva, že chemikália pôsobí na štítnu žľazu.

48. Vyhodnotenie testovaných živočíchov z hľadiska prítomnosti urýchleného vývinu v porovnaní s kontrolnou populáciou bude založené na výsledkoch štatistických analýz uskutočnených pre tieto štyri sledované parametre:

— dĺžka zadných končatín (normalizovaná vzhľadom na SVL) v 7. deň štúdie,

— dĺžka zadných končatín (normalizovaná vzhľadom na SVL) v 21. deň štúdie,

— vývinové štádium v 7. deň štúdie,

— vývinové štádium v 21. deň štúdie.

49. Štatistické analýzy dĺžky zadných končatín by sa mali vykonať na základe meraní dĺžky ľavej zadnej končatiny. Dĺžka zadných končatín sa normalizuje podľa pomeru dĺžky zadných končatín a dĺžky od pysku po kloaku jedinca. Následne sa porovnajú priemery normalizovaných hodnôt pre každú úroveň koncentrácie chemikálie. Urýchlenie vývinu sa potom udáva ako významný nárast priemernej dĺžky zadných končatín (normalizovanej) v skupine s aplikovanou chemikáliou v porovnaní s kontrolnou skupinou v 7. deň a/alebo 21. deň štúdie (pozri dodatok 3).

50. Štatistické analýzy vývinového štádia by sa mali vykonať na základe stanovenia vývinových štádií podľa morfologických kritérií opísaných Nieuwkoopom a Faberom (8). K urýchlenému vývinu došlo vtedy, keď sa v multikvantovej analýze zistí významný nárast hodnôt vývinového štádia v skupine s aplikovanou chemikáliou v porovnaní s kontrolnou skupinou v 7. deň a/alebo 21. deň štúdie.

51. V testovacej metóde skúšky AMA sa významný vplyv na ktorýkoľvek zo štyroch uvedených sledovaných parametrov považuje za dostatočný na jednoznačné stanovenie urýchleného vývinu. To znamená, že významný vplyv na dĺžku zadných končatín v určitom časovom bode si nevyžaduje potvrdenie významným vplyvom na dĺžku zadných končatín v inom časovom bode ani významným vplyvom na vývinové štádium v tomto konkrétnom časovom bode. A ďalej, významný vplyv na vývinové štádium v určitom časovom bode si nevyžaduje potvrdenie významným vplyvom na vývinové štádium v inom časovom bode ani významným vplyvom na dĺžku zadných končatín v tomto konkrétnom časovom bode. Váha dôkazov o urýchlenom vývine sa však zvýši ak sa významný vplyv zistí pre viacero sledovaných parametrov.

Asynchrónny vývin (stanovený podľa kritérií vývinového štádia)

52. Asynchrónny vývin je charakterizovaný narušením relatívneho načasovania morfogenézy alebo vývinu rôznych tkanív konkrétnej žubrienky. Nemožnosť jasne stanoviť vývinové štádium organizmu pomocou súboru morfologických sledovaných parametrov považovaných za typické pre príslušné štádium naznačuje, že tkanivá sa počas metamorfózy vyvíjajú asynchrónne. Asynchrónny vývin je ukazovateľom pôsobenia na štítnu žľazu. Jediné známe spôsoby účinku vyvolávajúce asynchrónny vývin sú prostredníctvom pôsobenia chemikálií na periférnu činnosť hormónu štítnej žľazy a/alebo metabolizmus hormónu štítnej žľazy vo vyvíjajúcich sa tkanivách ako sa to zaznamenalo v prípade inhibítorov dejodinázy.

53. Hodnotenie testovacích živočíchov z hľadiska prítomnosti asynchrónneho vývinu v porovnaní s kontrolnou populáciou bude založené na hodnotení výrazných morfologických znakov testovacích živočíchov v 7. a 21. deň štúdie.

54. Opis normálneho vývinu *Xenopus laevis* od Nieuwkoopa a Fabera (8) poskytuje rámec na identifikáciu poradia normálnej remodelácie tkaniva. Pojem ‚asynchrónny vývin' sa osobitne vzťahuje na odchýlky vo vývine

výrazných morfologických znakov žubrienok, ktoré znemožňujú konečné stanovenie vývinového štádia podľa kritérií Nieuwkoopa a Fabera (8), lebo hlavné morfologické znaky majú charakteristiky rôznych štádií.

55. Ako napovedá pojem ‚asynchrónny vývin', do úvahy sa majú brať len prípady odchýlok v pokroku remodelácie konkrétnych tkanív v porovnaní s pokrokom remodelácie iných tkanív. Niektoré klasické fenotypy zahŕňajú oneskorenie alebo neprítomnosť vzniku predných končatín napriek normálnemu alebo urýchlenému vývinu zadných končatín a tkanív chvosta alebo predčasnú resorpciu žiabier vzhľadom na štádium morfogenézy zadných končatín a resorpcie chvosta. Živočích sa zaznamená ako vyvíjajúci sa asynchrónne ak ho nemožno zaradiť do žiadneho štádia, lebo nespĺňa väčšinu zásadných vývinových kritérií pre dané štádium podľa Niewkoopa a Fabera (8) alebo ak došlo k mimoriadnemu oneskoreniu alebo urýchleniu vývinu jedného alebo viacerých kľúčových znakov (napr. chvost sa úplne resorboval, ale nevytvorili sa predné končatiny). Toto posúdenie sa vykonáva kvalitatívne a malo by vychádzať z preskúmania celého súboru znakov uvádzaných Nieuwkoopom a Faberom (8). Nie je však potrebné zaznamenať vývinové štádium rôznych zásadných znakov pozorovaných živočíchov. Živočíchy zaznamenané ako vyvíjajúce sa asynchrónne sa nezaradia do žiadneho vývinového štádia podľa Nieuwkoopa a Fabera (8).

56. Hlavným kritériom na stanovenie prípadov abnormálneho morfologického vývinu ako ‚asynchrónneho vývinu' je teda to, že relatívne načasovanie remodelácie tkaniva a morfogenézy tkaniva sú narušené, zatiaľ čo morfológia postihnutých tkanív nie je zjavne abnormálna. Jedným príkladom na ilustráciu tejto interpretácie výrazných morfologických abnormalít je skutočnosť, že oneskorená morfogenéza zadných končatín vzhľadom na vývin iných tkanív bude spĺňať kritérium ‚asynchrónneho vývinu', kým prípady chýbajúcich zadných končatín abnormálnych prstov (napr. ektrodaktýlie, polydaktýlie) alebo iných zjavných malformácií končatín by sa nemali považovať za ‚asynchrónny vývin'.

57. Hlavné morfologické znaky, ktoré by sa mali hodnotiť z hľadiska koordinovaného vývinu počas metamorfózy, by preto mali zahŕňať morfogenézu zadných končatín, morfogenézu predných končatín, vznik predných končatín, štádium resorpcie chvosta (najmä resorpcie chvostovej plutvy) a morfológiu hlavy (napr. veľkosť žiabier a štádium resorpcie žiabier, morfológiu dolnej čeľuste, vyčnievanie Meckelovej chrupky).

58. V závislosti od spôsobu účinku chemikálie sa môžu objaviť rôzne výrazné morfologické fenotypy. Niektoré klasické fenotypy zahŕňajú oneskorenie alebo neprítomnosť vzniku predných končatín napriek normálnemu alebo urýchlenému vývinu zadných končatín a tkanív chvosta a predčasnú resorpciu žiabier vzhľadom na remodeláciu zadných končatín a chvosta.

Histopatológia

59. Ak chemikália nespôsobuje zjavnú toxicitu a neurýchľuje vývin ani nespôsobuje asynchrónny vývin, vyhodnotí sa histopatológia štítnej žľazy podľa príslušného usmerňovacieho dokumentu (9). Oneskorenie vývinu je v neprítomnosti toxicity významným ukazovateľom pôsobenia proti štítnej žľaze, ale analýza vývinového štádia je menej citlivá a menej diagnostická ako histopatologická analýza štítnej žľazy. Preto sa v tomto prípade vyžaduje vykonanie histopatologických analýz štítnych žliaz. Vplyv na histológiu štítnej žľazy sa preukázal aj v neprítomnosti vplyvu na vývin. Ak sa zistia zmeny v histopatológii štítnej žľazy, chemikália sa považuje za pôsobiacu na štítnu žľazu. Ak sa nepozorujú žiadne oneskorenia vývinu ani histologické lézie štítnych žliaz, chemikália sa považuje za nepôsobiacu na štítnu žľazu. Odôvodnenie tohto rozhodnutia spočíva v tom, že štítna žľaza je pod vplyvom TSH a každá chemikália, ktorá zmení hladinu hormónu štítnej žľazy v krvnom obehu dostatočne na to, aby zmenila sekréciu TSH, bude mať za následok histopatologické zmeny v štítnej žľaze. Hladinu hormónu štítnej žľazy v krvnom obehu môžu zmeniť rôzne spôsoby a mechanizmy účinku. To znamená, že hoci hladina hormónu štítnej žľazy svedčí o vplyve na štítnu žľazu, nestačí to na určenie, ktorý spôsob alebo mechanizmus účinku je príčinou odozvy.

60. Keďže tento sledovaný parameter nemožno určiť s použitím základných štatistických prístupov, stanovenie vplyvu spojeného s expozíciou chemikálii vykoná patológ odborným posudkom.

Oneskorený vývin (stanovený podľa vývinovej fázy, HLL, BW, SVL)

61. Oneskorený vývin môže byť spôsobený mechanizmami pôsobenia proti štítnej žľaze a prostredníctvom nepriamej toxicity. Mierne oneskorenia vývinu spojené so zjavnými známkami toxicity pravdepodobne nasvedčujú nešpecifickému toxickému účinku. Hodnotenie netyreoideálnej toxicity je základným prvkom testu

v záujme zníženia pravdepodobnosti falošných pozitívnych výsledkov. Nadmerná úmrtnosť je evidentnou známkou výskytu iných toxických mechanizmov. Podobne aj mierne spomalenie rastu stanovené na základe mokrej hmotnosti a/alebo SVL nasvedčuje netyreoideálnej toxicite. Zjavné zrýchlenie rastu sa bežne pozoruje v prípade chemikálií, ktoré negatívne ovplyvňujú normálny vývin. Prítomnosť väčších živočíchov preto nevyhnutne neznamená netyreoideálnú toxicitu. Pri stanovení tyreoideálnej toxicity sa však nikdy nemožno spoliehať len na rast. Rast v spojení s vývinovým štádiom a histopatológiou štítnej žľazy by sa mal použiť skôr na stanovenie pôsobenia na štítnu žľazu. Pri stanovovaní zjavnej toxicity by sa mali zvážiť aj ďalšie sledované parametre vrátane edému, krvavých lézií, letargie, zníženej spotreby potravy, nesprávneho/zmeneného plávania atď. Ak sa pri všetkých testovaných koncentráciách vyskytnú známky zjavnej toxicity, testovaná chemikália by sa mala znova vyhodnotiť pri nižších testovaných koncentráciách predtým, než sa určí, či chemikália potenciálne pôsobí alebo nepôsobí na štítnu žľazu.

62. Štatisticky významné oneskorenia vývinu v neprítomnosti iných známok zjavnej toxicity nasvedčujú tomu, že chemikália pôsobí na štítnu žľazu (antagonisticky). V neprítomnosti významných štatistických odoziev môžu tento výsledok podporiť výsledky histopatologického vyšetrenia štítnej žľazy.

Štatistické analýzy

63. Štatistické analýzy údajov by podľa možnosti mali vychádzať z postupov uvedených v dokumente Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návod na používanie (11). Na všetky spojité kvantitatívne sledované parametre (HLL, SVL, mokrá hmotnosť) zodpovedajúce monotónnemu priebehu krivky závislosti dávka-odpoveď sa má použiť Jonckheereho-Terpstrov test aplikovaný zostupne na stanovenie významného účinku chemikálie.

64. V prípade spojitých sledovaných parametrov, ktoré nezodpovedajú monotónnemu priebehu krivky závislosti dávka-odpoveď, sa má vyhodnotiť normalita údajov (podľa možnosti pomocou Shapirovho-Wilkovho testu alebo Andersonovho-Darlingovho testu) a homogenita rozptylu (podľa možnosti pomocou Leveneho testu). Obidva testy sa vykonávajú na rezíduách z analýzy ANOVA. Namiesto týchto formálnych testov normality a homogenity rozptylu možno použiť odborný posudok, ale uprednostňujú sa formálne testy. Ak sa zistí nenormalita alebo heterogenita rozptylu, je potrebné vykonať normalizačnú transformáciu na stabilizáciu rozptylu. Ak majú údaje (možno po transformácii) normálnu distribúciu s homogénnym rozptylom, významný vplyv chemikálie sa stanoví pomocou Dunnettovho testu. Ak majú údaje (možno po transformácii) normálnu distribúciu s heterogénnym rozptylom, významný vplyv chemikálie sa stanoví pomocou Tamhaneho-Dunnettovho alebo T3 testu alebo pomocou Mann-Whitneyho-Wilcoxonovho U testu. Ak nie je možné použiť žiadnu normalizačnú transformáciu, významný vplyv chemikálie sa stanoví pomocou Mann-Whitneyho-Wilcoxonovho U testu s použitím Bonferroniho-Holmovej úpravy hodnôt p. Dunnettov test sa uplatňuje nezávisle od akéhokoľvek F-testu analýzy ANOVA a Mann-Whitneyho test sa uplatňuje nezávisle od celkového Kruskallovho-Wallisovho testu.

65. Významná úmrtnosť sa neočakáva, ale treba ju vyhodnotiť pomocou zostupného Cochranovho-Armitageovho testu ak údaje zodpovedajú monotónnosti odozva na dávku a v ostatných prípadoch pomocou Fisherovho exaktného testu s Bonferroniho-Holmovou úpravou.

66. Významný vplyv chemikálie na vývinové štádium sa stanovuje pomocou zostupnej aplikácie Jonckheereho-Terpstrovho testu na mediány replikátov. Na stanovenie vplyvu sa odporúča použiť aj multikvantový Jonckheereho test od 20. do 80. percentilu, lebo zohľadňuje zmeny v distribučnom profile.

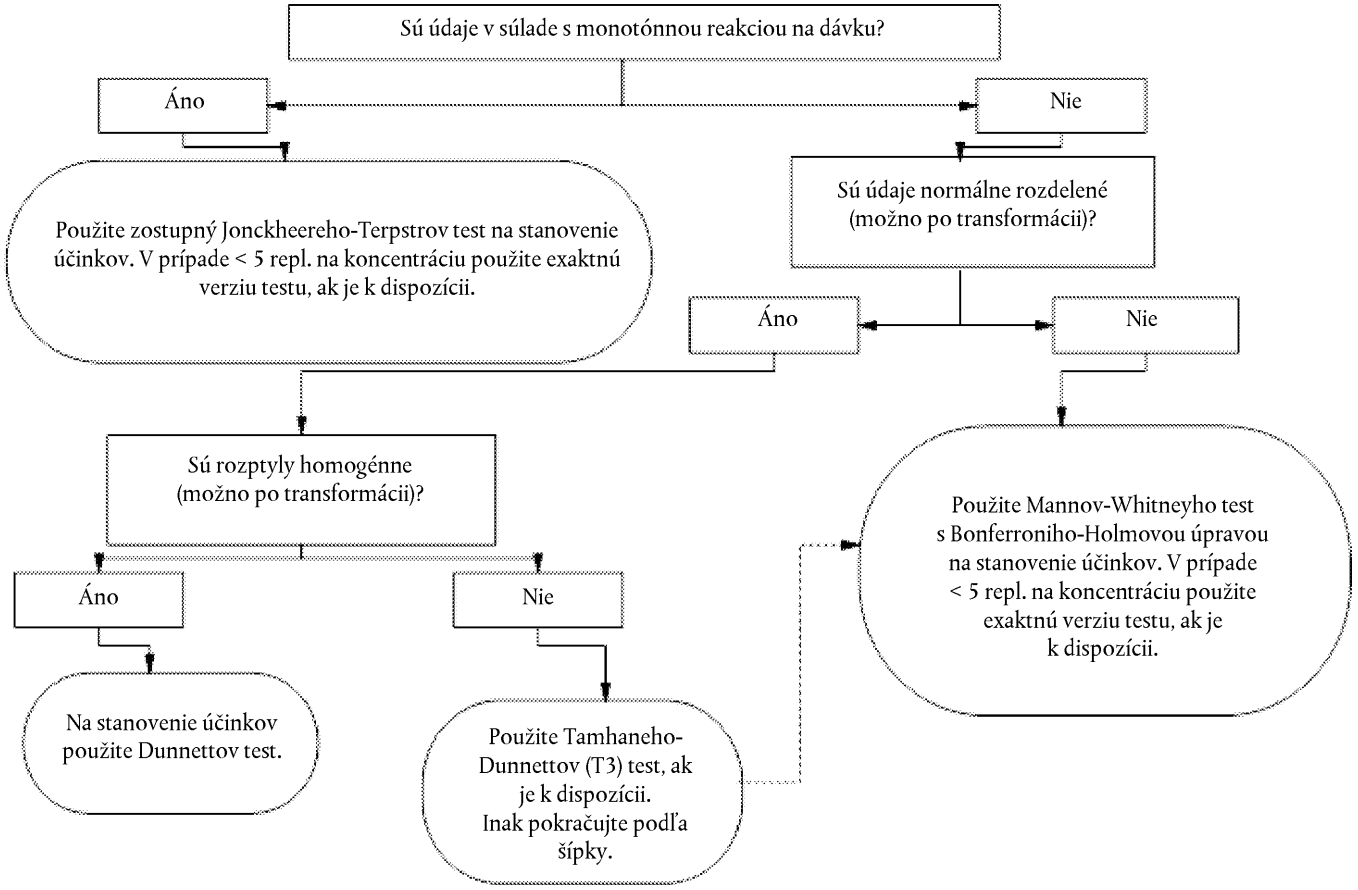
67. Vhodnou jednotkou analýzy je replikát, aby údaje predstavovali mediány pre replikáty ak sa používa Jonckheereho-Terpstrov alebo Mann-Whitneyho U test alebo priemery pre replikáty ak sa používa Dunnettov test. Monotónnosť odozvy na dávku možno posúdiť vizuálne na základe priemerov alebo mediánov pre replikáty alebo koncentrácie chemikálie alebo pomocou už opísaných formálnych testov (11).V prípade menej ako piatich replikátov na koncentráciu chemikálie alebo kontrolnú skupinu by sa podľa možnosti mali použiť verzie s presnou permutáciou Jonckheereho-Terpstrovho testu a Mann-Whitneyho testu. Štatistická významnosť všetkých uvedených testov sa posudzuje na hladine významnosti 0,05.

68. Obrázok 4 predstavuje vývojový diagram vykonávania štatistických testov na spojitých údajoch.

Obrázok 4

Vývojový diagram štatistických prístupov v prípade údajov o spojitej odozve

Schéma pre spojitú reakciu



Osobitné aspekty analýzy údajov

Používanie úrovní narušenia skupiny s určitou koncentráciou chemikálie

69. Pri rozhodovaní, či replikát alebo celá skupina s určitou koncentráciou chemikálie vykazuje zjavnú toxicitu a mala by sa vylúčiť z analýzy, sa zohľadňuje viacero faktorov. Zjavná toxicita je vymedzená > 2 úhynmi v ktoromkoľvek z replikátov, ktoré možno vysvetliť iba toxicitou a nie technickou chybou. Iné známky zjavnej toxicity zahŕňajú krvácanie abnormálne správanie abnormálne vzory plávania anorexiu a akékoľvek iné klinické známky choroby. V prípade subletálnych známok toxicity môžu byť potrebné kvalitatívne hodnotenia, ktoré by sa vždy mali vykonať porovnaním s kontrolnou skupinou s čistou vodou.

Kontrolné skupiny s rozpúšťadlom

70. O použití rozpúšťadla by sa malo uvažovať až ako o poslednej možnosti ak sa zvážili všetky ostatné možnosti aplikovania chemikálie. Ak sa použije rozpúšťadlo, mala by sa zároveň vykonať analýza kontrolnej skupiny s čistou vodou. Po skončení testu by sa malo vykonať hodnotenie potenciálneho vplyvu rozpúšťadla. To sa dosiahne štatistickým porovnaním kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom a kontrolnej skupiny s čistou vodou. Najdôležitejšie sledované parametre, ktoré treba zohľadniť v tejto analýze, sú vývinové štádium, SVL a mokrá hmotnosť, lebo môžu byť ovplyvnené netyreoideálnou toxicitou. Ak sa zistia štatisticky významné rozdiely v týchto sledovaných parametroch medzi kontrolnou skupinou s čistou vodou a kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom, stanovte sledované parametre štúdie pre merania odozvy s použitím kontrolnej skupiny s čistou vodou. Ak sa nezistí štatisticky významný rozdiel medzi kontrolnou skupinou s čistou vodou a kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom v žiadnej z nameraných závisle premenných, stanovte sledované parametre štúdie pre merania odozvy s použitím spojenej kontrolnej skupiny s riediacou vodou a rozpúšťadlom.

Skupiny s aplikovanou chemikáliou, ktoré dosiahli vývinové štádium 60 a vyššie

71. Po štádiu 60 sa pri žubrienkach prejaví zníženie veľkosti a hmotnosti v dôsledku resorpcie tkaniva a zníženia celkového obsahu vody. Merania mokrej hmotnosti a SVL preto nemožno primerane použiť na štatistické analýzy na zistenie rozdielov v rýchlostiach rastu. Údaje o mokrej hmotnosti a dĺžke organizmov v štádiu > NF60 by sa preto mali cenzurovať a nemožno ich použiť na analýzy priemerov alebo mediánov pre replikáty. Na analýzu týchto parametrov rastu možno použiť dva rozdielne prístupy.

72. Jedným prístupom je použiť na štatistické analýzy mokrej hmotnosti a/alebo SVL len žubrienky s vývinovým štádiom 60 alebo nižším. Predpokladá sa, že tento prístup poskytuje dostatočne spoľahlivé informácie o závažnosti možných vplyvov na rast, pokiaľ sa z analýz odstráni iba malá časť testovacích živočíchov (≤ 20 %). Ak sa vývin po štádiu 60 zistí pri zvýšenom počte žubrienok (≥ 20 %) v prípade jednej alebo viacerých nominálnych koncentrácií, mala by sa na všetkých žubrienkach vykonať dvojfaktorová ANOVA s hierarchickou štruktúrou rozptylu na vyhodnotenie vplyvu na rast v dôsledku aplikovania chemikálie so zohľadnením vplyvu vývinu po neskoré štádium na rast. Dodatok 3 obsahuje usmernenie o dvojfaktorovej analýze ANOVA hmotnosti a dĺžky.

LITERATÚRA

1. OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paríž.

2. OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paríž.

3. OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paríž.

4. OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paríž.

5. ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. American Society for Testing and Materials aSTM E729-96(2002), Philadelpia, PA.

6. ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98.

7. Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. a Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, s. 539 – 551.

8. Nieuwkoop,P.D. a Faber,J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York.

9. OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paríž.

10. Dodd,M.H.I. a Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.) academic Press, New York, s. 467 – 599.

11. OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paríž.

12. Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; s. 69 – 92.

Dodatok 1

Tabuľka 1

Podmienky pokusu pre 21-dňovú skúšku metamorfózy obojživelníkov

Testovací živočích		Larvy *Xenopus laevis*	
Počiatočné larválne štádium		Štádium 51 podľa Nieuwkoopa a Fabera	
Obdobie expozície		21 dní	
Kritériá výberu lariev		Vývinové štádium a celková dĺžka (voliteľné)	
Testované koncentrácie		Minimálne tri koncentrácie s rozsahom približne jednej rádovej hodnoty	
Režim expozície		Prietokový (prednostne) a/alebo statický obnovovací	
Prietok testovacieho systému		25 ml/min. (výmena celého objemu približne každých 2,7 hod.)	
Základné sledované parametre/dni stanovenia		Úmrtnosť	Denne
		Vývinové štádium	7. a 21. deň
		Dĺžka zadných končatín	7. a 21. deň
		Dĺžka od pysku po kloaku	7. a 21. deň
		Mokrá telesná hmotnosť	7. a 21. deň
		Histológia štítnej žľazy	21. deň
Riediaca voda/laboratórna kontrola		Odchlórovaná voda z vodovodu (filtrovaná pomocou drevného uhlia) alebo rovnocenný laboratórny zdroj	
Hustota lariev		20 lariev/testovaciu nádobu (5/l)	
Testovací roztok/testovacia nádoba		4 – 10 l (minimálna hĺbka vody 10 – 15 cm)/testovacia nádoba zo skla alebo nehrdzavejúcej ocele (napr. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Opakovanie		4 testovacie nádoby s replikátmi/testovanú koncentráciu a kontrolnú skupinu	
Prípustná úmrtnosť v kontrolných skupinách		≤ 10 % na testovaciu nádobu s replikátom	
Fixácia štítnej žľazy	Počet fixovaných jedincov	Všetky žubrienky (5/replikát sa vyhodnotí na začiatku)	
	Oblasť	Hlava alebo celé telo	
	Fixačná kvapalina	Davidsonov fixačný prostriedok	

Kŕmenie	Potrava	Sera Micron® alebo rovnocenná
	Množstvo/frekvencia	Kŕmny režim pre potravu Sera Micron® sa nachádzajú v tabuľke 1.
Osvetlenie	Fotoperióda	12 hod. svetlo: 12 hod. tma
	Intenzita	600 – 2 000 luxov (merané na povrchu vody)
Teplota vody		22° ± 1 °C
pH		6,5 – 8,5
Koncentrácia rozpusteného kyslíka		> 3,5 mg/l (> 40 % rozpustnosť vzdušného kyslíka)
Harmonogram odoberania vzoriek na chemickú analýzu		Raz za týždeň (4 odobratia vzorky/test)

Dodatok 2

Oznamovacie tabuľky pre nespracované údaje a súhrnné údaje

Tabuľka 1

Všeobecné informácie o testovanej chemikálii

Informácie o chemikálii			
	Uveďte testovanú chemikáliu, jednotky koncentrácie a testované koncentrácie		
	Testovaná chemikália:		
	Jednotky koncentrácie:		
	Testovaná koncentrácia 1		
	Testovaná koncentrácia 2		
	Testovaná koncentrácia 3		
	Testovaná koncentrácia 4		
	Dátum (0. deň):		Uveďte dátum (mm/dd/rr)
	Dátum (7. deň):		Uveďte dátum (mm/dd/rr)
	Dátum (21. deň):		Uveďte dátum (mm/dd/rr)

Tabuľka 2

Hárky na zaznamenanie nespracovaných údajov v 7. a 21. deň

DEŇ X
DÁTUM 00/00/00

	Koncentrácia	Číslo koncentrácie	Číslo replikátu	Číslo jedinca	Identifikátor jedinca	Vývinové štádium	Dĺžka SVL (mm)	Dĺžka zadných končatín (mm)	Mokrá hmotnosť celého organizmu (mg)
RIADOK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	ŠTÁDIUM	BL	HLL	HMOTNOSŤ
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							

	Koncentrácia	Číslo koncentrácie	Číslo replikátu	Číslo jedinca	Identifikátor jedinca	Vývinové štádium	Dĺžka SVL (mm)	Dĺžka zadných končatín (mm)	Mokrá hmotnosť celého organizmu (mg)
RIADOK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	ŠTÁDIUM	BL	HLL	HMOTNOSŤ
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							

	Koncentrácia	Číslo koncentrácie	Číslo replikátu	Číslo jedinca	Identifikátor jedinca	Vývinové štádium	Dĺžka SVL (mm)	Dĺžka zadných končatín (mm)	Mokrá hmotnosť celého organizmu (mg)
RIADOK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	ŠTÁDIUM	BL	HLL	HMOTNOSŤ
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							

	Koncentrácia	Číslo koncentrácie	Číslo replikátu	Číslo jedinca	Identifikátor jedinca	Vývinové štádium	Dĺžka SVL (mm)	Dĺžka zadných končatín (mm)	Mokrá hmotnosť celého organizmu (mg)
RIADOK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	ŠTÁDIUM	BL	HLL	HMOTNOSŤ
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							

Tabuľka 3

Vypočítané zhrnutia údajov o sledovaných parametroch zo 7. a 21. dňa

		Vývinové štádium			SVL (mm)		Dĺžka zadných končatín (mm)		Hmotnosť (mg)	
TRT	REP	MIN.	MEDIÁN	MAX.	PRIEMER	ŠTD. ODCH.	PRIEMER	ŠTD. ODCH.	PRIEMER	ŠTD. ODCH.
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!

Poznámka: Výpočty hodnôt v bunkách sú prepojené s údajmi v tabuľke 2.

Tabuľka 4

Údaje o dennej úmrtnosti

Deň testu	Dátum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Počet replikátov		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Počet aplikovaní chemikálie		0				0				0				0			

Poznámka: Výpočty hodnôt v bunkách sú prepojené s údajmi v tabuľke 1.

Tabuľka 5

Kritériá kvality vody

Expozičný systém (prietokový/statický obnovovací):
Teplota:
Intenzita svetla:
Cyklus svetla a tmy:
Potrava:
Dávka krmiva:
pH vody:
Koncentrácia jódu v testovacej vode:

Tabuľka 6

Súhrnné chemické údaje

Názov chemikálie:																					
Č. CAS:																					
Deň testu	Dátum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				

Názov chemikálie:																					
Č. CAS:																					
Deň testu	Dátum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Poznámka: Výpočty hodnôt v bunkách sú prepojené s údajmi v tabuľke 1.

Tabuľka 7

Histopatologické oznamovacie tabuľky pre hlavné kritériá

Dátum: Chemikália: Patológ:

ID kontrolného živočícha - replikát 1		Hypertrofia štítnej žľazy	Atrofia štítnej žľazy	Hypertrofia folikulárnych buniek	Hyperplázia folikulárnych buniek
ID kontrolného živočícha - replikát 2					
Spolu:					

ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 1		Hypertrofia štítnej žľazy	Atrofia štítnej žľazy	Hypertrofia folikulárnych buniek	Hyperplázia folikulárnych buniek
ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 2					
Spolu:					

ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 1		Hypertrofia štítnej žľazy	Atrofia štítnej žľazy	Hypertrofia folikulárnych buniek	Hyperplázia folikulárnych buniek
ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 2					
Spolu:					

ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 1		Hypertrofia štítnej žľazy	Atrofia štítnej žľazy	Hypertrofia folikulárnych buniek	Hyperplázia folikulárnych buniek
ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 2					
Spolu:					

Tabuľka 8

Ďalšie histopatologické kritériá

Dátum: Chemikália: Patológ:

ID kontrolného živočícha - replikát 1		Zväčšenie plochy folikulárnej dutiny	Zmenšenie plochy folikulárnej dutiny
ID kontrolného živočícha - replikát 2			
Spolu:			

ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 1		Zväčšenie plochy folikulárnej dutiny	Zmenšenie plochy folikulárnej dutiny
ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 2			
Spolu:			

ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 1		Zväčšenie plochy folikulárnej dutiny	Zmenšenie plochy folikulárnej dutiny
ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 2			
Spolu:			

ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 1		Zväčšenie plochy folikulárnej dutiny	Zmenšenie plochy folikulárnej dutiny
ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 2			
Spolu:			

Tabuľka 9

Slovné opisy histopatologických nálezov

Dátum:

Chemikália:

Patológ:

		Slovný opis
ID kontrolného živočícha - replikát 1		
ID kontrolného živočícha - replikát 2		
ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 1		
ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 2		

ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 1		
ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 2		

ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 1		
ID živočícha dostávajúceho dávku - replikát 2		

Tabuľka 10

Vzor súhrnnej oznamovacej tabuľky pre deň × (7. alebo 21.) skúšky AMA

		Kontrola				Dávka 1					Dávka 2					Dávka 3				
Sledovaný parameter	Replikát	Priemer	SD	CV	N	Priemer	SD	CV	N	Hodnota p	Priemer	SD	CV	N	Hodnota p	Priemer	SD	CV	N	Hodnota p
Dĺžka zadných končatín (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Priemer:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Priemer:																			
Mokrá hmotnosť (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Priemer:																			

Tabuľka 11

Vzor súhrnnej oznamovacej tabuľky pre údaje o vývinovom štádiu v deň × (7. alebo 21.) skúšky AMA

		Kontrola				Dávka 1					Dávka 2					Dávka 3				
	Replikát	Medián	Min.	Max.	N	Medián	Min.	Max.	N	Hodnot-a p	Medián	Min.	Max.	N	Hodnot-a p	Medián	Min.	Max.	Medián	Hodnota p
Vývinové štádium	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Priemer:																			

Dodatok 3

Alternatívna analýza hmotnosti a dĺžky v prípade vývinu po neskoré štádium u viac ako 20 % žubrienok pri jednej alebo viacerých koncentráciách

Ak sa vývin po štádiu 60 zistí pri zvýšenom počte žubrienok (≥ 20 %) v prípade jednej alebo viacerých nominálnych koncentrácií, mala by sa na všetkých žubrienkach vykonať dvojfaktorová ANOVA s hierarchickou štruktúrou rozptylu na vyhodnotenie vplyvu na rast v dôsledku aplikovania chemikálie so zohľadnením vplyvu vývinu po neskoré štádium na rast.

Navrhuje sa použiť všetky údaje, ale zohľadniť vplyv vývinu po neskoré štádium. Možno to urobiť pomocou dvojfaktorovej analýzy ANOVA s hierarchickou štruktúrou rozptylu. Definujte parameter LateStage = ‚Yes' pre živočícha vo vývinovom štádiu 61 alebo neskoršom. Inak definujte parameter LateStage = ‚No'. Potom možno vykonať dvojfaktorovú analýzu ANOVA s koncentráciou a premennou LateStage a ich interakciou, pričom Rep(Conc) sa použije ako náhodný faktor a Tadpole(Rep) ako ďalší náhodný vplyv. Parameter rep sa tak stále bude považovať za jednotku analýzy, pričom výsledky budú v zásade rovnaké ako v prípade analýzy priemerov rep*latestage vážených podľa počtu živočíchov na priemer. Ak údaje porušujú požiadavky analýzy ANOVA na normalitu alebo homogenitu rozptylu, na odstránenie tejto prekážky možno použiť normalizovanú transformáciu na poradia.

Okrem štandardných F-testov analýzy ANOVA na vyhodnotenie vplyvu premenných Conc, LateStage a ich vzájomných interakcií možno interakčný F-test ‚rozrezať' na dva ďalšie F-testy analýzy ANOVA: jeden pre priemerné reakcie naprieč koncentráciami pre LateStage = ‚No' a druhý pre priemerné reakcie naprieč koncentráciami pre LateStage = ‚Yes'. Ďalšie porovnania priemerov pre jednotlivé aplikované koncentrácie chemikálie s kontrolnými skupinami sa vykonajú pre každú úroveň premennej LateStage. Možno vykonať trendovú analýzu pomocou vhodných kontrastov alebo jednoduché párové porovnania ak existuje dôkaz o nemonotónnom priebehu krivky závislosti dávka-odpoveď na určitej úrovni premennej LateStage. Bonferroniho-Holmova úprava hodnôt p sa robí iba vtedy, keď zodpovedajúci F-rez nie je významný. Možno to urobiť v SAS a pravdepodobne aj v iných štatistických softvérových balíkoch. Komplikácie môžu nastať v prípade, že pri niektorých koncentráciách nie sú žiadne živočíchy v neskoršom štádiu, ale tieto situácie možno vyriešiť jednoduchým spôsobom.

Dodatok 4

Vymedzenie pojmov

Chemikália:: látka alebo zmes.

Testovaná chemikália:: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

C.39. **TEST ROZMNOŽOVANIA CHVOSTOSKOKOV V PÔDE**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 232 (2009). Táto testovacia metóda je určená na posúdenie účinkov chemikálií na výstup reprodukcie chvostoskokov v pôde. Je založená na jestvujúcich postupoch (1) (2). Partenogenetický druh *Folsomia candida* a pohlavne sa rozmnožujúci druh *Folsomia fimetaria* sú dva z najprístupnejších druhov chvostoskokov (*Collembola*), možno ich kultivovať a sú komerčne dostupné. Ak je nutné posudzovať osobitné biotopy, na ktorých tieto dva druhy nežijú, postup je možné rozšíriť aj na iné druhy chvostoskokov ak spĺňajú kritériá validity testu.

2. Pôdne chvostoskoky sú ekologicky významné druhy z hľadiska ekotoxikologického testovania. Chvostoskoky sú šesťnožce s tenkým exoskeletom vysokopriepustným pre vzduch a vodu a predstavujú druhy článkonožcov s odlišným spôsobom a mierou expozície v porovnaní s dážďovkami a druhmi čeľade *Enchytraeidae*.

3. Hustota populácií chvostoskokov v pôde a vrstvách opadaných listov v mnohých suchozemských ekosystémoch zvyčajne dosahuje 10^5 m^{-2} (3) (4). Dospelé jedince zvyčajne merajú 0,5 – 5 mm, pričom ich podiel na celkovej živočíšnej biomase a respirácii v pôde je nízky – odhaduje sa na 1 – 5 % (5). Ich najvýznamnejšou úlohou teda môže byť potenciálna regulácia procesov prostredníctvom predácie mikroorganizmov a mikrofauny. Chvostoskoky sú korisťou širokej škály endogeických a epigeických bezstavovcov ako sú roztoče, stonožky, pavúky, druhy čeľade *Carabidae* a drobčíky. Chvostoskoky sa podieľajú na procesoch rozkladu v kyslých pôdach, kde môžu byť najdôležitejšími pôdnymi bezstavovcami okrem čeľade *Enchytraeidae*, keďže dážďovky a mnohonôžky tu zvyčajne chýbajú.

4. *F. fimetaria* má celosvetové rozšírenie a je bežný vo viacerých druhoch pôdy od piesočnatých po hlinu a od pravého (dokonale rozloženého a premiešaného s pevnou fázou pôdy) po surový (nerozložený) humus. Je to bezoký nepigmentovaný chvostoskok. Bol zaznamenaný v poľnohospodárskych pôdach v celej Európe (6). Je všežravý, pričom súčasť jeho potravy tvoria hubové hýfy, baktérie, prvoky a detrit. Prostredníctvom spásania interaguje s infekciami húb rastlín spôsobenými patogénnymi hubami (7) a môže ovplyvňovať mykorízu ako to je známe v prípade *F. candida*. Tak ako väčšina druhov chvostoskokov, rozmnožuje sa pohlavne, pričom si vyžaduje nepretržitú prítomnosť samčekov, ktorí oplodňujú vajíčka.

5. *F. candida* je takisto rozšírený na celom svete. Hoci vo väčšine prírodných pôd nie je bežný, často sa vyskytuje vo veľmi vysokom počte na miestach bohatých na humus. Je to bezoký nepigmentovaný chvostoskok. Má dobre vyvinutú furku aktívne behá a pri vyrušení pohotovo skáče. Ekologická úloha *F. candida* je podobná úlohe *F. fimetaria*, ale biotopmi sú pôdy bohatšie na organické látky. Rozmnožuje sa partenogeneticky. Samčekovia sa môžu vyskytovať v počte menej než jeden na tisíc jedincov.

PRINCÍP TESTU

6. Synchrónne dospelé (*F. fimetaria*) alebo mladé (*F. candida*) chvostoskoky sú vystavené účinkom rôznych koncentrácií testovanej chemikálie zamiešanej do modifikovanej umelo pripravenej pôdy (8) s použitím 5 % obsahu organickej hmoty (alebo alternatívnej pôdy). Vykonávanie testu možno rozdeliť na dva kroky:

   — test na vyhľadávanie rozsahu v prípade, že nie sú k dispozícii dostatočné informácie o toxicite – v tomto teste sú hlavnými sledovanými parametrami úmrtnosť a rozmnožovanie, ktoré sa hodnotia po dvoch týždňoch v prípade *F. fimetaria* a po troch týždňoch v prípade *F. candida*,

   — hlavný reprodukčný test, v ktorom sa hodnotí celkový počet mladých jedincov vyprodukovaných rodičovskými živočíchmi a prežitie rodičovských živočíchov. Tento definitívny test trvá tri týždne v prípade *F. fimetaria* alebo štyri týždne v prípade *F. candida*.

   Toxické účinky testovanej chemikálie na úmrtnosť a výstup reprodukcie dospelých jedincov sú vyjadrené ako LC_x a EC_x, pričom na základe nelineárnej regresie sa stanoví vhodný model pre údaje s cieľom odhadnúť koncentráciu, ktorá by spôsobila x % úmrtnosť, resp. zníženie výstupu reprodukcie alebo alternatívne ako hodnota NOEC/LOEC (9).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

7. Je vhodné, aby boli známe fyzikálne vlastnosti, rozpustnosť vo vode, hodnota log K_{ow}, rozdeľovacia konštanta pôda – voda a tlak pary testovanej chemikálie. Potrebné sú aj ďalšie informácie o osude testovanej chemikálie v pôde, napríklad miera fotolýzy a hydrolýzy a biotická degradácia. Je potrebné uviesť aj chemickú identifikáciu testovanej chemikálie podľa názvoslovia IUPAC, číslo CAS, šaržu, dávku, štrukturálny vzorec a čistotu ak sú k dispozícii.

8. Táto testovacia metóda sa môže použiť na chemikálie rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Spôsob aplikácie testovanej chemikálie sa však podľa toho bude líšiť. Testovacia metóda nie je použiteľná v prípade prchavých chemikálií, t. j. chemikálií, ktorých Henryho konštanta alebo rozdeľovacia konštanta vzduch – voda je vyššia, ako jeden alebo chemikálií, ktorých tlak pary je vyšší ako 0,0133 Pa pri 25 °C.

VALIDITA TESTU

9. Na to, aby sa výsledky testu mohli považovať za platné, musia kontrolné skupiny bez aplikovanej chemikálie spĺňať tieto kritériá:

— priemerná úmrtnosť dospelých jedincov nesmie presiahnuť 20 % na konci testu,

— priemerný počet mladých jedincov na nádobu by mal byť aspoň 100 na konci testu,

— variačný koeficient vypočítaný pre počet mladých jedincov by mal byť nižší ako 30 % na konci hlavného testu.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

10. Referenčná chemikália by sa mala testovať pri koncentrácii EC_{50} pre vybratý druh testovacej pôdy buď v pravidelných intervaloch alebo podľa možnosti v rámci každého testovacieho kola na overenie, že odozva testovacích organizmov v testovacom systéme je na normálnej úrovni. Vhodnou referenčnou chemikáliou je kyselina boritá, ktorá by mala znížiť rozmnožovanie o 50 % (10) (11) pri približne 100 mg/kg suchej hmotnosti pôdy pre obidva druhy.

OPIS TESTU

Testovacie nádoby a vybavenie

11. Vhodnými testovacími nádobami sú nádoby s kapacitou na umiestnenie 30 g vlhkej pôdy. Mali by byť zo skla alebo inertného plastu (netoxického). Použitiu plastových nádob sa však treba vyhnúť ak je expozícia testovanej chemikálii znížená v dôsledku sorpcie. Testovacie nádoby by mali mať prierez umožňujúci, aby bola skutočná hĺbka pôdy v testovacej nádobe 2 – 4 cm. Nádoby by mali mať viečka (napr. zo skla alebo z polyetylénu) navrhnuté tak, aby sa znížilo odparovanie vody a zároveň sa umožnila výmena plynov medzi pôdou a atmosférou. Nádoba by mala byť aspoň čiastočne priehľadná, aby umožňovala prenos svetla.

12. Vyžaduje sa bežné laboratórne vybavenie, konkrétne:

— skrinka na sušenie,

— stereomikroskop,

— pH-meter a luxmeter,

— vhodné presné váhy,

— vhodné vybavenie na reguláciu teploty,

— vhodné vybavenie na reguláciu vlhkosti vzduchu (nie je to nevyhnutné ak sú expozičné nádoby zakryté viečkami),

— inkubátor alebo malá miestnosť s regulovanou teplotou,

— pinzety alebo zariadenie s nízkym sacím prietokom vzduchu.

Príprava testovacej pôdy

13. Používa sa umelo pripravená pôda (8) s obsahom organickej hmoty 5 %. Alternatívne možno použiť prírodnú pôdu, keďže umelo pripravená pôda sa nepodobá prírodnej pôde. Odporúčané zloženie umelo pripravenej pôdy (na základe suchej hmotnosti vysušenej na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C) je takéto:

— 5 % rašeliny vysušenej vzduchom a jemne rozomletej (prijateľná je veľkosť častíc 2 mm ± 1 mm),

— 20 % kaolínu (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %),

— približne 74 % priemyselného piesku vysušeného vzduchom (v závislosti od množstva potrebného $CaCO_3$), prevažne jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 mikrónov – presné množstvo piesku závisí od množstva $CaCO_3$ (pozri ďalej), pričom spolu by mali predstavovať až 75 %,

— 1,0 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, rozomletého na prach analyticky čistého) na dosiahnutie pH 6,0 ± 0,5, pričom množstvo pridaného uhličitanu vápenatého môže závisieť najmä od kvality/charakteru rašeliny (pozri poznámku 1).

Poznámka 1: Potrebné množstvo $CaCO_3$ bude závisieť od zložiek pôdneho substrátu a malo by sa určiť meraním pH podvzoriek vopred inkubovanej vlhkej pôdy bezprostredne pred testom.

Poznámka 2: Odporúča sa odmerať pH a prípadne aj pomer C/N, kapacitu katiónovej výmeny (CEC) a obsah organickej hmoty v pôde, aby v neskoršej fáze bolo možné vykonať normalizáciu a lepšie interpretovať výsledky.

Poznámka 3: Ak to je potrebné, napríklad na osobitné testovacie účely ako testovací a/alebo kultivačný substrát sa môžu použiť aj prírodné pôdy z neznečistených miest. Ak sa však použije prírodná pôda, je nutné uviesť aspoň jej pôvod (miesto odberu), pH, textúru (distribúciu veľkosti častíc), CEC a obsah organickej hmoty a pôda nesmie byť kontaminovaná. V prípade prírodnej pôdy sa odporúča pred jej použitím v hlavnom teste preukázať jej vhodnosť na test a na splnenie kritérií validity testu.

14. Suché zložky pôdy sa dôkladne zmiešajú (napr. vo veľkokapacitnom laboratórnom miešači). Maximálna kapacita zadržiavania vody (WHC) umelo pripravenej pôdy sa určí v súlade s postupmi opísanými v dodatku 5. Obsah vlhkosti testovacej pôdy by sa mal optimalizovať tak, aby sa dosiahla kyprá priepustná štruktúra pôdy umožňujúca chvostoskokom vstupovať do pórov. Zvyčajne to je 40 – 60 % maximálnej WHC.

15. Suchá umelo pripravená pôda sa vopred zvlhčí pridaním dostatočného množstva deionizovanej vody na získanie približne polovice konečného obsahu vody dva až sedem dní pred začiatkom testu, aby sa vyvážila/stabilizovala kyslosť. Na stanovenie pH sa použije zmes pôdy a 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) v pomere 1:5 (podľa dodatku 6). Ak je pôda kyslejšia ako požadovaný rozsah, možno ju upraviť pridaním príslušného množstva $CaCO_3$. Ak je pôda príliš zásaditá, možno ju upraviť pridaním anorganickej kyseliny neškodnej pre chvostoskoky.

16. Vopred zvlhčená pôda sa rozdelí na časti zodpovedajúce počtu testovaných koncentrácií (a podľa potreby referenčnej chemikálii) a kontrolných skupín použitých v teste. Pridajú sa testované chemikálie a obsah vody sa reguluje podľa bodu 24.

Výber a príprava testovacích živočíchov

17. Odporúčaný druh je partenogenetický *F. candida*, lebo v medzilaboratórnej porovnávacej skúške testovacej metódy (11) tento druh splnil kritériá validity pre prežívanie častejšie ako *F. fimetaria*. Ak sa použije alternatívny druh, musí spĺňať kritériá validity uvedené v bode 9. Na začiatku testu majú byť živočíchy dobre kŕmené a majú byť vo veku 23 – 26 dní v prípade *F. fimetaria* a 9 – 12 dní v prípade *F. candida*. Pre každý replikát by počet jedincov *F. fimetaria* mal byť desať samčekov a desať samičiek. V prípade *F. candida* sa má použiť desať samičiek (pozri dodatok 2 a dodatok 3). Synchrónne živočíchy sa náhodne odoberú z misiek a skontroluje sa ich zdravotný a fyzický stav pre každú dávku pridanú do replikátu. Každá skupina 10/20 jedincov sa pridá do náhodne vybratej testovacej nádoby a vyberú sa veľké samičky *F. fimetaria*, aby sa ľahko odlíšili od samčekov *F. fimetaria*.

Príprava testovaných koncentrácií

18. Možno použiť štyri metódy aplikácie testovanej chemikálie: 1. zamiešanie testovanej chemikálie do pôdy s vodou ako nosičom, 2. zamiešanie testovanej chemikálie do pôdy s organickým rozpúšťadlom ako nosičom, 3. zamiešanie testovanej chemikálie do pôdy s pieskom ako nosičom alebo 4. aplikovanie testovanej chemikálie na povrch pôdy. Výber vhodnej metódy závisí od vlastností chemikálie a účelu testu. Vo všeobecnosti sa odporúča zamiešať testovanú chemikáliu do pôdy. Môže však byť potrebné použiť postupy, ktoré sú v súlade s praktickým použitím testovanej chemikálie (napr. nastriekanie kvapalnej formy alebo použitie špeciálnych pesticídových prípravkov ako sú granuly alebo moridlá osiva). Pôda sa takto pripraví pred pridaním chvostoskokov okrem prípadov, keď sa testovaná chemikália pridáva na povrch pôdy – vtedy sa má najskôr chvostoskokom umožniť vstúpiť do pôdy.

Testovaná chemikália rozpustná vo vode

19. Roztok testovanej chemikálie sa pripraví v deionizovanej vode v dostatočnom množstve pre všetky replikáty jednej testovanej koncentrácie. Každý roztok testovanej chemikálie sa pred pridaním do testovacej nádoby dôkladne premieša s jednou dávkou vopred zvlhčenej pôdy.

Testovaná chemikália nerozpustná vo vode

20. V prípade chemikálií nerozpustných vo vode, ale rozpustných v organických rozpúšťadlách, sa testovaná chemikália môže rozpustiť v čo najmenšom možnom objeme vhodného rozpúšťadla (napr. acetónu), ktorý zabezpečí riadne zamiešanie chemikálie do pôdy a jej zmiešanie s požadovanou časťou kremenného piesku. Mali by sa používať iba prchavé rozpúšťadlá. Ak sa použije organické rozpúšťadlo, všetky testované koncentrácie a doplnkový negatívny kontrolný roztok rozpúšťadla by mali obsahovať rovnaké minimálne množstvo rozpúšťadla. Aplikačné nádoby by mali určitý čas zostať nezakryté, aby sa rozpúšťadlo použité na aplikovanie testovanej chemikálie mohlo odpariť, aby tak v tom čase nedošlo k rozptylu toxickej chemikálie.

Testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode a v organických rozpúšťadlách

21. V prípade chemikálií, ktoré sú slabo rozpustné vo vode a v organických rozpúšťadlách, sa kremenný piesok, ktorý by mal byť súčasťou celkového množstva piesku pridaného do pôdy, zmieša s množstvom testovanej chemikálie potrebnej na dosiahnutie požadovanej testovanej koncentrácie. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do vopred zvlhčenej pôdy, potom sa pridá primerané množstvo deionizovanej vody, aby sa získal požadovaný obsah vlhkosti a všetko sa dôkladne premieša. Konečná zmes sa rozdelí medzi testovacie nádoby. Postup sa zopakuje pre každú testovanú koncentráciu a pripraví sa aj vhodný kontrolný roztok.

Aplikácia testovanej chemikálie na povrch pôdy

22. Ak je testovaná chemikália pesticíd, môže byť vhodné aplikovať ju na povrch pôdy nastriekaním. Urobí sa to až po pridaní chvostoskokov. Testovacie nádoby sa najskôr naplnia zvlhčeným pôdnym substrátom, pridajú sa živočíchy a potom sa testovacie nádoby odvážia. S cieľom predísť priamej expozícii živočíchov testovanej chemikálii priamym kontaktom, testovaná chemikália sa aplikuje najskôr polhodinu po pridaní chvostoskokov. Testovaná chemikália by sa mala aplikovať na povrch pôdy čo najrovnomernejšie pomocou vhodného laboratórneho striekacieho zariadenia, aby sa simuloval postrek v teréne. Aplikovanie by sa malo uskutočniť pri teplote s odchýlkou ± 2 °C a v prípade vodných roztokov, emulzií alebo disperzií s rýchlosťou aplikovania vody v súlade s odporúčaniami na posúdenie rizika. Rýchlosť sa má overiť s použitím vhodnej kalibračnej metódy. Špeciálne prípravky ako granuly alebo moridlá osiva sa môžu aplikovať spôsobom, ktorý je v súlade s poľnohospodárskym použitím. Po nastriekaní sa pridá potrava.

POSTUP

Podmienky testu

23. Priemerná teplota pri teste by mala byť 20 °C ± 1 °C s rozsahom teplôt 20 °C ± 2 °C. Test sa vykonáva za regulovaných cyklov svetla a tmy (podľa možnosti 12 hodín svetla a 12 hodín tmy) pri osvetlení 400 – 800 luxov v priestore testovacích nádob.

24. Na účely kontroly vlhkosti pôdy sa nádoby odvážia na začiatku, v strede a na konci testu. Úbytok hmotnosti > 2 % sa dopĺňa pridaním deionizovanej vody. Je potrebné poznamenať, že úbytok vody možno znížiť udržiavaním vysokej vlhkosti vzduchu (> 80 %) v testovacom inkubátore.

25. Hodnota pH by sa mala odmerať na začiatku a konci testu na vyhľadávanie rozsahu i hlavného testu. Merania by sa mali vykonať aj na jednej dodatočnej kontrolnej vzorke a jednej dodatočnej vzorke z pôdnych vzoriek s aplikovanou chemikáliou (všetky koncentrácie), ktorá sa pripravila a udržiavala rovnakým spôsobom ako testovacie kultúry, ale bez pridania chvostoskokov.

Postup testu a merania

26. Pre každú testovanú koncentráciu sa množstvo testovacej pôdy zodpovedajúce 30 g hmotnosti v natívnom stave umiestni do testovacej nádoby. Pripravia sa aj vodné kontrolné vzorky bez testovanej chemikálie. Ak sa na aplikáciu testovanej látky používa vehikulum, okrem testovacej série sa má vykonať jedna kontrolná séria obsahujúca len vehikulum. Koncentrácia rozpúšťadla alebo dispergantu musí byť rovnaká ako koncentrácia použitá v testovacích nádobách obsahujúcich testovanú chemikáliu.

27. Jednotlivé chvostoskoky sa opatrne prenesú do každej testovacej nádoby (pridelia sa náhodne) a umiestnia na povrch pôdy. Na účinný prenos živočíchov sa môže použiť zariadenie s nízkym sacím prietokom vzduchu. Počet replikátov pre testované koncentrácie a kontrolné skupiny závisí od použitej koncepcie testu. Testovacie nádoby sa náhodne umiestnia do testovacieho inkubátora a tieto pozície sa raz týždenne znova opätovne randomizujú.

28. V teste *F. fimetaria* sa má použiť 20 dospelých jedincov (desať samčekov a desať samičiek) vo veku 23 – 26 dní na testovaciu nádobu. V 21. deň sa chvostoskoky extrahujú z pôdy a spočítajú. V dávke synchronizovaných jedincov *F. fimetaria* použitej v teste sa pohlavia rozlíšia podľa veľkosti. Samičky sú zreteľne väčšie ako samčekovia (pozri dodatok 3).

29. V teste *F. candida* sa má použiť desať mladých jedincov vo veku 9 – 12 dní na testovaciu nádobu. V 28. deň sa chvostoskoky extrahujú z pôdy a spočítajú.

30. Ako vhodný zdroj potravy sa na začiatku testu a po približne dvoch týždňoch do každej nádoby pridá dostatočné množstvo, napr. 2 – 10 mg, granulovaného sušeného pekárskeho droždia komerčne dostupného na použitie v domácnosti.

31. Na konci testu sa hodnotí úmrtnosť a rozmnožovanie. Po troch týždňoch (*F. fimetaria*) alebo štyroch týždňoch (*F. candida*) sa chvostoskoky extrahujú z testovacej pôdy (pozri dodatok 4) a spočítajú (12). Chvostoskok, ktorého sa nepodarí extrahovať, sa zaznamená ako mŕtvy. Metódy extrakcie a počítania by mali byť validované. Validita zahŕňa účinnosť extrakcie mladých jedincov vyššiu ako 95 %, napr. pridaním známeho počtu do pôdy.

32. Praktické zhrnutie a harmonogram postupu testu sú uvedené v dodatku 2.

Koncepcia testu

Test na vyhľadávanie rozsahu

33. V prípade potreby sa vykoná test na vyhľadávanie rozsahu napríklad s piatimi koncentráciami testovanej chemikálie 0,1; 1,0; 10; 100 a 1 000 mg/kg suchej hmotnosti pôdy v dvoch replikátoch pre každú testovanú koncentráciu a kontrolnú skupinu. Pri rozhodovaní o rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú na test na vyhľadávanie rozsahu, môžu byť užitočné aj dodatočné informácie o úmrtnosti alebo rozmnožovaní chvostoskokov z testov s podobnými chemikáliami alebo z literatúry.

34. Test na vyhľadávanie rozsahu trvá dva týždne pre *F. fimetaria* a tri týždne pre *F. candida*, aby sa zabezpečila produkcia jednej znášky mladých jedincov. Na konci testu sa vyhodnotí úmrtnosť a rozmnožovanie chvostoskokov. Je potrebné zaznamenať počet dospelých jedincov a objavenie sa mladých jedincov.

Hlavný test

35. Na stanovenie hodnoty EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) by sa malo otestovať dvanásť koncentrácií. Odporúča sa použiť aspoň dva replikáty na každú testovanú koncentráciu chemikálie a šesť kontrolných replikátov. Faktor odstupu sa môže meniť v závislosti od charakteru odozvy na dávku.

36. Na stanovenie hodnoty NOEC/LOEC je potrebné otestovať aspoň päť koncentrácií v geometrickom rade. Odporúčajú sa štyri replikáty na každú testovanú koncentráciu chemikálie plus osem kontrolných skupín. Koncentrácie by mali mať faktor odstupu nepresahujúci 1,8.

37. Kombinovaný prístup umožňuje stanovenie hodnôt NOEC/LOEC i ECx. V rámci tohto kombinovaného prístupu sa má použiť osem koncentrácií chemikálie v geometrickom rade. Odporúčajú sa štyri replikáty na každú koncentráciu chemikálie plus osem kontrolných skupín. Koncentrácie by mali mať faktor odstupu nepresahujúci 1,8.

38. Ak sa v teste na vyhľadávanie rozsahu nezistia žiadne účinky pri najvyššej koncentrácii (t. j. 1 000 mg/kg), možno reprodukčný test vykonať ako limitný test s použitím testovanej koncentrácie 1 000 mg/kg a kontrolnej skupiny. Limitný test poskytne príležitosť preukázať, že neexistuje štatisticky významný účinok pri limitnej koncentrácii. Má sa použiť osem replikátov pre pôdu s aplikovanou chemikáliou ako aj pre kontrolnú skupinu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

39. Hlavným sledovaným parametrom je výstup reprodukcie (napr. počet mladých jedincov vyprodukovaný na testovaciu nádobu). V štatistickej analýze, napr. v postupoch analýzy ANOVA, sa porovnajú populácie s aplikovanou chemikáliou pomocou Studentovho t-testu, Dunnettovho testu alebo Williamsovho testu. Pre priemery jednotlivých populácií sa vypočítajú 95 % intervaly spoľahlivosti.

40. Hlavným kritériom validity, ktoré by sa malo zdokumentovať, je počet prežívajúcich dospelých jedincov v kontrolných skupinách bez aplikovanej chemikálie. Tak ako v prípade testu na vyhľadávanie rozsahu sa do záverečnej správy majú uviesť aj všetky ostatné škodlivé známky.

LC_x a EC_x

41. Hodnoty ECx vrátane príslušných dolných a horných 95 % hraníc spoľahlivosti pre daný parameter sa vypočítajú pomocou vhodných štatistických metód (napr. logistickej alebo Weibullovej funkcie, Spearman-Karberovej metódy s orezanými údajmi alebo jednoduchej interpolácie). Hodnota ECx sa získa vložením hodnoty zodpovedajúcej x % priemeru kontrolnej skupiny do zistenej rovnice. Na účely výpočtu hodnoty EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty ECx sa na úplnom súbore údajov vykoná regresná analýza. Hodnota LC_{50} sa zvyčajne odhaduje probitovou analýzou alebo podobnou analýzou zohľadňujúcou binomicky distribuované údaje o úmrtnosti.

NOEC/LOEC

42. Ak je cieľom štatistickej analýzy určiť hodnotu NOEC/LOEC, vyžadujú sa štatistiky pre jednotlivé nádoby (ktoré sa považujú za replikáty). Mali by sa použiť vhodné štatistické metódy podľa dokumentu OECD 54 o súčasných prístupoch k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návodu na používanie (9). Vo všeobecnosti sa nepriaznivé účinky testovanej chemikálie v porovnaní s kontrolnou skupinou analyzujú pomocou jednostranného testu hypotézy s $p \leq 0{,}05$.

43. Normálnu distribúciu a homogenitu rozptylu možno otestovať pomocou vhodného štatistického testu, napr. Shapiro-Wilkovho testu, resp. Leveneho testu ($p \leq 0{,}05$). Možno vykonať jednosmernú analýzu rozptylu (ANOVA) a následné viacnásobné porovnávacie testy. Viacnásobné porovnávania (napr. Dunnettov test) alebo zostupné trendové testy (napr. Williamsov test) sa môžu použiť na vypočítanie, či existujú významné rozdiely ($p \leq 0{,}05$) medzi kontrolnými skupinami a rôznymi koncentráciami testovanej chemikálie [výber odporúčaného testu podľa dokumentu OECD 54 (9)]. Na stanovenie hodnôt NOEC a LOEC možno použiť aj iné neparametrické metódy (napr. Bonferroniho U-test podľa Holma alebo Jonckheereho-Terpstrov trendový test).

Limitný test

44. Ak sa vykonal limitný test (porovnanie kontrolnej skupiny a len jednej koncentrácie chemikálie) a boli splnené predpoklady parametrických testovacích postupov (normalita, homogenita), metrické reakcie možno vyhodnotiť pomocou Studentovho testu (t-testu). Ak tieto podmienky neboli splnené, možno použiť t-test s nerovnomerným rozptylom (Welchov t-test) alebo neparametrický test, napríklad Mann-Whitneyho U-test.

45. Na stanovenie významných rozdielov medzi kontrolnými skupinami (kontrolná skupina a kontrolná skupina s rozpúšťadlom) možno replikáty z každej kontrolnej skupiny otestovať podľa opisu pre limitný test. Ak sa v týchto testoch nezistia významné rozdiely, všetky replikáty kontrolnej skupiny a kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom možno spojiť. V opačnom prípade sa všetky koncentrácie chemikálie majú porovnať s kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom.

Protokol o skúške

46. Protokol o skúške musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— totožnosť testovanej chemikálie, šaržu, dávku a číslo CAS, čistotu,

— fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie [napr. log Kow, rozpustnosť vo vode, tlak pary, Henryho konštantu (H) a podľa možnosti informácie o osude testovanej chemikálie v pôde] ak sú k dispozícii,

— ak sa netestuje čistá chemikália, je potrebné uviesť zloženie testovanej chemikálie a prídavné látky.

Testovacie organizmy

— identifikácia druhu a dodávateľa testovacích organizmov, opis podmienok chovu a rozsah veku testovacích organizmov.

Podmienky testu

— opis návrhu a postupu experimentu,

— údaje o príprave testovacej pôdy, podrobné špecifikácie ak sa použije prírodná pôda (pôvod, história, distribúcia veľkosti častíc, pH, obsah organickej hmoty),

— kapacita pôdy zadržiavať vodu,

— opis metódy použitej na aplikáciu testovanej chemikálie do pôdy,

— podmienky testu: intenzita svetla, trvanie cyklov svetla a tmy, teplota,

— opis kŕmneho režimu, druh a množstvo potravy použitej v teste, dátumy kŕmenia,

— pH a obsah vody v pôde na začiatku a konci testu (kontrolná skupina a každá koncentrácia chemikálie),

— podrobný opis metódy extrakcie a účinnosť extrakcie.

Výsledky testu

— počet mladých jedincov zistený v každej testovacej nádobe na konci testu,

— počet dospelých jedincov a ich úmrtnosť (%) v každej testovacej nádobe na konci testu,

— opis zjavných fyziologických alebo patologických príznakov alebo výrazných zmien v správaní,

— výsledky získané s referenčnou testovanou chemikáliou,

— hodnoty NOEC/LOEC, LC_x pre úmrtnosť a EC_x pre rozmnožovanie (väčšinou LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} a EC_{10}) s 95 % intervalmi spoľahlivosti, graf vhodného modelu použitého na výpočet, rovnica jeho funkcie a jeho parametre [pozri (9)],

— všetky informácie a pozorovania, ktoré môžu pomôcť pri interpretácii výsledkov,

— spoľahlivosť testu ak sa vykonáva testovanie hypotéz (9),

— odchýlky od postupov opísaných v tejto testovacej metóde a všetky nezvyčajné udalosti počas testu,

— validita testu,

— ak sa odhaduje hodnota NOEC, minimálny zistiteľný rozdiel.

LITERATÚRA

1. Wiles JA a Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis, F. candida* and *F. fimetaria*. V Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), s. 131 – 156. John Wiley a Sons, Ltd., Chichester.

2. ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. Medzinárodná organizácia pre normalizáciu, Ženeva.

3. Burges A a Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. Londýn.

4. Petersen H a 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 *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. V New trends in soil Biology (Lebrun Ph andré HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30. august – 2. september 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, s. 261 – 268.

8. kapitola C.36 tejto prílohy, *Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil*.

9. OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paríž

10. Scott-Fordsmand JJ a Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 s. Danish Ministry for the Environment.

11. Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, s. 66.

12. Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201 – 205

13. Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

14. Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. V Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, Londýn, s. 412 – 416

15. Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96: 138 – 140.

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na túto testovaciu metódu sa vzťahujú tieto vymedzenia pojmov (v tomto teste sú všetky účinné koncentrácie vyjadrené ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy):

Chemikália je látka alebo zmes.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa nepozoruje žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného času expozície v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

LOEC (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom) je najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá má štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného času expozície v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

ECx (účinná koncentrácia pre účinok x %) je koncentrácia, ktorá v rámci daného času expozície vyvolá x % účinok na testovacie organizmy v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Napríklad EC_{50} je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že v stanovenom čase expozície vyvolá účinok na sledovaný parameter testu v 50 % exponovanej populácie.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Dodatok 2

Hlavné úkony a harmonogram na vykonanie testu chvostoskokov

Kroky testu možno zhrnúť takto:

Čas (deň)	Úkon
– 23. až – 26.	Príprava synchrónnej kultúry *F. fimetaria*
–14.	Príprava umelo pripravenej pôdy (zmiešanie suchých zložiek) Kontrola pH umelo pripravenej pôdy a úprava podľa potreby Odmeranie maximálnej WHC pôdy
– 9. až – 12.	Príprava synchrónnej kultúry *F. candida*
– 2. až – 7.	Predbežné zvlhčenie pôdy
– 1.	Rozdelenie mladých jedincov do dávok Príprava zásobných roztokov a aplikovanie testovanej chemikálie ak je potrebné rozpúšťadlo
0.	Príprava zásobných roztokov a aplikovanie testovanej chemikálie ak ide o pevnú chemikáliu, chemikáliu rozpustnú vo vode alebo ak sa vyžaduje povrchová aplikácia Odmeranie pH pôdy a hmotnosti nádob Pridanie potravy. Pridanie chvostoskokov.
14.	Test na vyhľadávanie rozsahu pre *F. fimetaria*: ukončenie testu, extrakcia živočíchov, odmeranie pH pôdy a straty vody (hmotnosť) Hlavné testy: odmeranie obsahu vlhkosti, doplnenie vody a pridanie 2 – 10 mg droždia
21.	Hlavný test pre *F. fimetaria*: ukončenie testu, extrakcia živočíchov, odmeranie pH pôdy a straty vody (hmotnosť) Test na vyhľadávanie rozsahu pre *F. candida*: ukončenie testu, extrakcia živočíchov, odmeranie pH pôdy a straty vody (hmotnosť)
28.	Hlavný test pre *F. candida*: ukončenie testu, extrakcia živočíchov, odmeranie pH pôdy a straty vody (hmotnosť)

Dodatok 3

Usmernenia na chov a synchronizáciu *F. fimetaria* a *F. candida*

Pre každý konkrétny kmeň chvostoskokov je potrebné overiť, či časy a trvania uvedené v tomto usmernení umožňujú dostatočnú synchronizáciu mladých jedincov. Výskyt kladenia vajíčok po prenose dospelých jedincov do čerstvého substrátu a liahnutia vajíčok v zásade určujú vhodný deň na zber vajíčok a synchrónnych mláďat.

Odporúča sa mať trvalú zásobnú kultúru skladajúcu sa napr. z 50 nádob/Petriho misiek. Zásobná kultúra by sa mala udržiavať v dobrom stave výživy kŕmením raz za týždeň, pridávaním vody a odstraňovaním starej potravy a uhynutých jedincov. Príliš málo chvostoskokov na substráte môže mať za následok inhibíciu v dôsledku intenzívnejšieho rastu plesní. Ak sa zásobná kultúra používa na produkciu vajíčok príliš často, môže sa unaviť. Známky únavy sú mŕtve dospelé jedince a pleseň na substráte. Zvyšné vajíčka z produkcie synchrónnych živočíchov možno použiť na oživenie kultúry.

V synchrónnej kultúre *F. fimetaria* sa samčekovia a samičky predovšetkým rozlišujú podľa veľkosti. Samčekovia sú výrazne menší než samičky a pohybujú sa rýchlejšie než samičky. Správny výber pohlavia si vyžaduje malú prax a možno ho potvrdiť mikroskopickou kontrolou pohlavnej oblasti (13).

1. **Chov**

1.a. *Príprava kultivačného substrátu*

Kultivačný substrát je sadra (síran vápenatý) s aktívnym uhlím. Takto sa zabezpečí vlhkosť substrátu, pričom funkciou uhlia je absorbovať odpadové plyny a exkrementy (14) (15). Na uľahčenie pozorovania chvostoskokov možno použiť rôzne formy uhlia. Napríklad v prípade *F. candida* a *F. fimetaria* sa používa práškové uhlie (použitím ktorého sa vytvára čierna/sivá sadra).

Zložky substrátu:

— 20 ml aktívneho uhlia,

— 200 ml destilovanej vody,

— 200 ml sadry,

alebo

— 50 g aktívneho práškového uhlia,

— 260 – 300 ml destilovanej vody,

— 400 g sadry.

Zmes substrátu sa pred použitím nechá sadnúť.

1.b. *Rozmnožovanie*

Chvostoskoky sa držia v nádobách, napr. v Petriho miskách (90 mm × 13 mm), s dnom pokrytým 0,5 cm vrstvou substrátu zo sadry/uhlia. Kultivujú sa pri teplote 20 ± °1 °C a pri cykle svetla a tmy 12: 12 hodín (400 – 800 luxov). Nádoby sa nepretržite udržiavajú vlhké, aby bola relatívna vlhkosť vzduchu v nádobách 100 %. Možno to dosiahnuť prítomnosťou voľnej vody v poréznej sadre, ale bez vytvorenia vodného filmu na povrchu sadry. Strate vody je možné zabrániť vytvorením vlhkého okolitého vzduchu. Všetky mŕtve jedince ako aj plesnivá potrava, sa majú z nádob odstrániť. Na stimuláciu produkcie vajíčok je potrebné preniesť dospelé živočíchy do Petriho misiek s čerstvo pripraveným substrátom zo sadry/uhlia.

1.c. *Zdroj potravy*

Ako jediný zdroj potravy pre *F. candida* a *F. fimetaria* sa používa granulované sušené pekárske droždie. Čerstvá potrava sa poskytuje raz alebo dvakrát za týždeň, aby sa zabránilo vzniku plesní. Ukladá sa priamo na sadru v malej kôpke. Hmotnosť pridávaného pekárskeho droždia by sa mala prispôsobiť veľkosti populácie chvostoskokov, vo všeobecnosti však stačí 2 – 15 mg.

2. **Synchronizácia**

Test by sa mal vykonať so synchronizovanými živočíchmi, aby sa získali homogénne testované živočíchy toho istého instaru a veľkosti. Synchronizácia okrem toho umožňuje odlíšiť samčekov a samičky *F. fimetaria* vo veku tri týždne a staršie na základe pohlavného dimorfizmu, t. j. rozdielov vo veľkosti. Postup uvedený ďalej je odporúčaním ako získať synchronizované živočíchy (praktické kroky sú voliteľné).

2.a. *Synchronizácia*

— Pripravte nádoby s 0,5 cm vrstvou substrátu zo sadry/uhlia.

— Na účely znesenia vajíčok preneste 150 – 200 dospelých jedincov *F. fimetaria* a 50 – 100 jedincov *F. candida* z najlepších 15 – 20 nádob so zásobnou kultúrou so substrátom starým štyri až osem týždňov do nádob a živočíchy nakŕmte 15 mg pekárskeho droždia. Nedávajte spolu mladé a dospelé jedince, lebo prítomnosť mladých jedincov môže inhibovať produkciu vajec.

— Kultúru uchovávajte pri teplote 20 ± 1 °C (priemer by mal byť 20 ± °C) a cykle svetla a tmy 12 : 12 hodín (400 – 800 luxov). Zabezpečte prísun čerstvej potravy a saturáciu vzduchu vodou. Nedostatok potravy môže mať za následok, že živočíchy sa budú vyprázdňovať na vajíčka, čo môže spôsobiť rast plesní na vajíčkach, prípadne *F. candida* môže požierať vlastné vajíčka. Po desiatich dňoch sa vajíčka starostlivo zozbierajú ihlou a špachtľou a prenesú do ‚vajíčkového papiera' (malé kusy filtračného papiera ponorené do kaše zo sadry/uhlia), ktorý sa vloží do nádoby s čerstvým substrátom zo sadry/uhlia. Do substrátu sa pridá niekoľko zrniečok droždia na prilákanie mladých jedincov, aby opustili vajíčkový papier. Je dôležité, aby boli vajíčkový papier a substrát vlhké, inak sa vajíčka dehydrujú. Alternatívne je možné dospelé živočíchy po nakladení vajíčok vybrať zo synchronizačných kultivačných nádob na dva alebo tri dni.

— Po troch dňoch bude väčšina vajíčok na vajíčkovom papieri vyliahnutá, pričom niektoré mladé jedince sa môžu nachádzať pod vajíčkovým papierom.

— Ak chceme získať mladé jedince rovnakého veku, vajíčkový papier s nevyliahnutými vajíčkami vyberieme pinzetou z Petriho misky. Mláďatá, ktoré sú teraz vo veku 0 – 3 dni, zostanú v miske a kŕmia sa pekárskym droždím. Nevyliahnuté vajíčka sa vyradia z testu.

— Vajíčka a vyliahnuté mladé jedince sa kultivujú rovnakým spôsobom ako dospelé jedince. Konkrétne v prípade *F. fimetaria* by sa mali prijať tieto opatrenia: zabezpečiť dostatok čerstvej potravy, odstraňovať starú plesnivú potravu, po týždni mláďatá rozdeliť do nových Petriho misiek ak hustota prekračuje 200.

2.b. *Manipulácia s chvostoskokmi na začiatku testu*

— Jedince *F. candida* vo veku 9 – 12 dní alebo *F. fimetaria* vo veku 23 – 26 dní sa pozbierajú, napr. nasatím a vypustia do malej nádoby s vlhkým substrátom zo sadry/uhlia. Pomocou binokulárneho mikroskopu sa skontroluje ich fyzický stav (zranené a poškodené živočíchy sa odstránia). Všetky kroky by sa mali vykonať tak, aby boli chvostoskoky stále vo vlhkom prostredí, napr. na mokrom povrchu atď., aby sa predišlo stresu zo sucha.

— Otočte nádobu dnom nahor a poklepte na ňu, aby sa chvostoskoky presunuli do pôdy. Je potrebné neutralizovať statickú elektrinu, inak sa môže stať, že živočíchy budú lietať vo vzduchu alebo sa prilepia na stenu testovacej nádoby a vyschnú. Na neutralizáciu možno použiť ionizátor alebo vlhkú handru umiestnenú pod nádobou.

— Potrava by sa mala rozložiť po celom povrchu pôdy, nemala by zostať len v jednej hrudke.

— Počas prenosu a testovacieho obdobia by sa nemalo klopať na testovacie nádoby ani ich inak fyzicky narúšať, lebo by to mohlo zvýšiť zhutňovanie pôdy a obmedziť interakcie medzi chvostoskokmi.

3. **Alternatívne druhy chvostoskokov**

Na testovanie pomocou tejto testovacej metódy možno použiť aj iné druhy chvostoskokov, napríklad *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Pred použitím alternatívnych druhov je nutné splniť niekoľko predpokladov:

— majú byť jednoznačne určené,

— treba uviesť dôvody na ich výber,

— je potrebné zabezpečiť, aby bola do testovacej fázy zahrnutá reprodukčná biológia, aby bola potenciálnym cieľom počas expozície,

— je potrebné poznať históriu života: vek dosiahnutia dospelosti, trvanie vývinu vajíčok a instary, ktoré sú podrobené expozícii,

— testovací substrát a poskytovaná potrava musia poskytovať optimálne podmienky na rast a rozmnožovanie,

— variabilita musí byť dostatočne nízka na precízny a presný odhad toxicity.

Dodatok 4

Extrakcia a počítanie živočíchov

1. **Možno použiť dve metódy extrakcie.**

1.a. Prvá metóda: Možno použiť extraktor s kontrolovaným teplotným gradientom založený na zásadách MacFadyena (1). Teplo pochádza z vykurovacieho telesa na vrchu extrakčnej skrinky (regulovaného prostredníctvom termistora umiestneného na povrchu vzorky pôdy). Teplota v chladenej kvapaline okolo zbernej nádoby sa reguluje prostredníctvom termistora umiestneného na povrchu zbernej skrinky (umiestnenej pod povrchom pôdy). Termistory sú spojené s programovateľnou ovládacou jednotkou, ktorá zvyšuje teplotu podľa vopred naprogramovaného harmonogramu. Živočíchy sa zbierajú do chladenej zbernej skrinky (2 °C) so spodnou vrstvou zo sadry/uhlia. Extrakcia sa začína pri teplote 25 °C a teplota sa automaticky zvyšuje každých 12 hodín o 5 °C a celkovo trvá 48 hodín. Po 12 hodinách pri 40 °C sa extrakcia končí.

1.b. Druhá metóda: Po pokusnom inkubačnom období sa počet prítomných mladých chvostoskokov stanoví s použitím flotácie. Na tieto účely sa test vykoná v nádobách s objemom približne 250 ml. Na konci testu sa pridá približne 200 ml destilovanej vody. Pôda sa jemne premieša jemným štetcom, aby chvostoskoky stúpali k hladine vody. Do vody sa môže pridať malé množstvo, približne 0,5 ml, čierneho farbiva na tlač fotografií značky Kentmere na uľahčenie počítania zvýšením kontrastu medzi vodou a bielymi chvostoskokmi. Farbivo nie je pre chvostoskoky toxické.

2. **Počítanie:**

Počítanie možno vykonať voľným okom alebo pod svetelným mikroskopom s použitím mriežky umiestnenej na flotačnej nádobe alebo odfotografovaním povrchu každej nádoby a následným spočítaním chvostoskokov na zväčšených alebo premietaných snímkach. Počítanie možno vykonať aj s použitím digitálnych metód spracovania obrazu (12). Všetky postupy je potrebné validovať.

Dodatok 5

Určenie maximálnej hodnoty WHC pôdy

Táto metóda na určenie maximálnej kapacity zadržiavania vody (WHC) pôdy sa považuje za vhodnú. Je opísaná v prílohe C normy ISO DIS 11268-2 [Kvalita pôdy. Účinky znečisťujúcich látok na dážďovky (*Eisenia fetida*). Časť 2: Stanovenie účinkov na rozmnožovanie].

Odoberte stanovené množstvo (napr. 5 g) testovacieho pôdneho substrátu pomocou vhodného zariadenia na odber vzoriek (špirálového vzorkovača atď.). Zakryte spodnú časť rúrky kúskom mokrého filtračného papiera a potom ju umiestnite na stojan vo vodnom kúpeli. Rúrku treba postupne ponoriť, kým hladina vody nebude nad povrchom pôdy. Potom sa nechá vo vode približne tri hodiny. Keďže nie je možné zadržať všetku vodu absorbovanú pôdnymi kapilárami, vzorku pôdy treba nechať dve hodiny odvodniť tak, že rúrka sa umiestni na vrstvu veľmi mokrého jemného kremenného piesku v zakrytej nádobe (aby sa zabránilo vysušeniu). Vzorka sa potom odváži vysušená na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kapacita zadržiavania vody (WHC) sa vypočíta takto:

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

Kde:

S = substrát saturovaný vodou + hmotnosť rúrky + hmotnosť filtračného papiera,

T = hmotnosť obalu (hmotnosť rúrky + hmotnosť filtračného papiera),

D = suchá hmotnosť substrátu.

Dodatok 6

Stanovenie pH pôdy

Táto metóda stanovenia pH pôdy je založená na opise uvedenom v norme ISO DIS 10390: Kvalita pôdy – Stanovenie pH.

Stanovené množstvo pôdy sa suší pri izbovej teplote aspoň 12 hodín. Potom sa pripraví suspenzia pôdy (obsahujúca aspoň 5 g pôdy) v 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) analytickej triedy čistoty alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) analytickej triedy čistoty, ktorých objem zodpovedá päťnásobku objemu pôdy. Suspenzia sa potom dôkladne pretrepáva päť minút a potom sa nechá usadnúť aspoň na 2 hodiny, ale nie dlhšie ako 24 hodín. Hodnota pH kvapalnej fázy sa potom odmeria pomocou pH-metra, ktorý sa pred každým meraním kalibruje pomocou vhodnej série tlmivých roztokov (napr. pH 4,0 a 7,0).

C.40. TEST TOXICITY ŽIVOTNÉHO CYKLU *CHIRONOMIDAE* V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENEJ VODY ALEBO OBOHATENÉHO SEDIMENTU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 233 (2010). Je určená na posúdenie účinkov celoživotnej expozície sladkovodných dvojkrídlovcov *Chironomus sp.* chemikáliám s úplným pokrytím 1. generácie (generácie P) a začiatku 2. generácie (generácie F1). Je rozšírením existujúcich testovacích metód C.28 (1) a C.27 (15) za použitia expozičného scenára s obohatenou vodou, resp. s obohateným sedimentom. Zohľadňuje existujúce protokoly o testoch toxicity *Chironomus riparius* a *Chironomus dilutus* [predchádzajúci názov *C. tentans* (2)], ktoré boli vypracované v Európe a Severnej Amerike (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) a následne podrobené kruhovým testom (1) (7) (10) (11) (12). Môžu sa použiť aj iné dobre zdokumentované druhy pakomárov, napr. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Celkové trvanie expozície je približne 44 dní v prípade *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a približne 100 dní v prípade *C. dilutus*.

2. V tejto testovacej metóde je opísaný vodný i sedimentový expozičný scenár. Výber vhodného expozičného scenára závisí od plánovaného použitia testu. Vodný expozičný scenár zahŕňajúci obohatenie vodného stĺpca je určený na simuláciu prípadu postreku pesticídmi a zahŕňa počiatočnú maximálnu koncentráciu v povrchovej vode. Obohacovanie vody je užitočné aj pri iných druhoch expozície (vrátane chemických únikov), ale nie pri akumulačných procesoch v sedimente, ktoré trvajú dlhšie ako testovacie obdobie. V takom prípade a tiež vtedy, keď hlavným spôsobom vstupu pesticídov do vodných útvarov je odtok, môže byť vhodnejšou koncepcia s použitím obohateného sedimentu. V prípade záujmu o iné expozičné scenáre je možné test ľahko prispôsobiť. Ak je napríklad potrebné vyhnúť sa distribúcii testovanej chemikálie medzi vodnú fázu a vrstvu sedimentu a musí sa minimalizovať adsorpcia do sedimentu, možno zvážiť použitie náhradného umelého sedimentu (napr. kremenného piesku).

3. Chemikálie, ktoré si vyžadujú testovanie organizmov žijúcich v sedimente, môžu v sedimentoch dlho pretrvávať. Organizmy žijúce v sedimente môžu byť exponované viacerými spôsobmi. Relatívny význam každého spôsobu expozície a časové obdobie, v ktorom sa každý z nich podieľa na celkových toxických účinkoch, závisia od fyzikálno-chemických vlastností danej chemikálie. V prípade silno adsorbujúcich chemikálií alebo chemikálií, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, môže byť významným spôsobom expozície prijímanie kontaminovanej potravy. S cieľom nepodceniť toxicitu vysokolipofilných chemikálií možno zvážiť použitie potravy pridanej do sedimentu pred aplikáciou testovanej chemikálie (pozri bod 31). Je teda možné zahrnúť všetky spôsoby expozície a všetky štádiá života.

4. Merané sledované parametre sú celkový počet vykuklených dospelých jedincov (pre 1. a 2. generáciu), miera vývinu (pre 1. a 2. generáciu), pomer pohlaví úplne vykuklených a živých dospelých jedincov (pre 1. a 2. generáciu), počet šnúr vajíčok na samičku (len pre 1. generáciu) a fertilita šnúr vajíčok (len pre 1. generáciu).

5. Dôrazne sa odporúča použiť umelo pripravený sediment. Umelo pripravený sediment má oproti prírodným sedimentom viaceré výhody:

— zníži sa variabilita pokusu, lebo umelo pripravený sediment vytvára reprodukovateľnú ‚štandardizovanú matricu' a odstráni sa potreba získať nekontaminovaný čistý sediment,

— testy je možné začať kedykoľvek bez problému sezónnej variability v testovanom sedimente a nie je potrebné sediment vopred upraviť, aby sa odstránila pôvodná fauna,

— nižšie náklady v porovnaní s terénnym zberom dostatočného množstva potrebného na bežné testovanie,

— umelo pripravený sediment umožňuje porovnanie toxicity naprieč štúdiami a následné klasifikovať chemikálie (3).

6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

7. Larvy pakomárov v prvom instare sa exponujú rozsahu koncentrácií testovanej látky v systéme sediment – voda. Test sa začína umiestnením lariev v prvom instare (1. generácia) do testovacích kadičiek obsahujúcich obohatený sediment, prípadne sa testovaná chemikália aplikuje do vody po pridaní lariev. Vyhodnocuje sa vykuklenie pakomárov, čas do vykuklenia a pomer pohlaví úplne vykuklených a živých pakomárov. Vykuklené dospelé jedince sa prenesú do chovných klietok na uľahčenie rojenia, párenia a kladenia vajíčok. Vyhodnotí sa počet vyprodukovaných šnúr vajíčok a ich fertilita. Z týchto šnúr vajíčok sa získajú larvy 2. generácie v prvom instare. Tieto larvy sa umiestnia do čerstvo pripravených testovacích kadičiek (postup obohacovania ako pre 1. generáciu) na účely určenia životaschopnosti 2. generácie prostredníctvom vyhodnotenia vykuklenia, času do vykuklenia a pomeru pohlaví úplne vykuklených a živých pakomárov (schematické znázornenie testu životného cyklu je uvedené v dodatku 5). Všetky údaje sa analyzujú buď prostredníctvom regresného modelu na odhadnutie koncentrácie, ktorá by spôsobila X % pokles príslušného sledovaného parametra alebo prostredníctvom testovania hypotézy na stanovenie koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC). Pri druhom spôsobe je potrebné pomocou štatistických testov porovnať reakcie na chemikáliu s príslušnými kontrolnými reakciami. Treba poznamenať, že v scenári s obohatenou vodou môžu byť v prípade rýchlo degradujúcich chemikálií neskoršie životné štádiá každej generácie (napr. štádium kukly) vystavené podstatne nižšej úrovni koncentrácie v nadložnej vode ako larvy v 1. instare. Ak to predstavuje problém a je potrebná porovnateľná úroveň expozície každého životného štádia, treba zvážiť tieto úpravy testovacej metódy:

— paralelné pokusy s obohatením v rôznych životných štádiách alebo

— opakované obohatenie (alebo obnovenie nadložnej vody) testovacieho systému počas obidvoch fáz testovania (1. a 2. generácia), pričom intervaly obohacovania (obnovenia) by sa mali prispôsobiť charakteru osudu testovanej chemikálie.

Tieto zmeny sú možné iba v scenári s obohatenou vodou, ale nie v scenári s obohateným sedimentom.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

8. Je potrebné poznať rozpustnosť testovanej chemikálie vo vode, jej tlak pary, hodnotu log K_{ow}, namerané alebo vypočítané delenie do sedimentu a stabilitu vo vode a v sedimente. Mala by byť k dispozícii spoľahlivá analytická metóda so známou a zdokumentovanou presnosťou a detekčným limitom na kvantifikáciu testovanej chemikálie v nadložnej vode, vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu a sedimente. Medzi užitočné informácie patrí štruktúrny vzorec a čistota testovanej chemikálie. Užitočnou informáciou je tiež chemický osud testovanej chemikálie (napr. rozptýlenie abiotická a biotická degradácia atď.). Ďalšie usmernenia pre testované chemikálie s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v literatúre (16).

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

9. Referenčné chemikálie sa môžu testovať pravidelne ako prostriedok na zabezpečenie, že sa nezmenila citlivosť laboratórnej populácie. Tak ako v prípade dafnií stačí vykonať 48-hodinový test akútnej toxicity (podľa bodu 17). Kým však nebude k dispozícii validované usmernenie pre akútnu toxicitu, možno zvážiť použitie testu chronickej toxicity podľa kapitoly C.28 tejto prílohy. Príkladmi referenčných toxických látok, ktoré sa úspešne používajú v kruhových testoch a validačných štúdiách, sú: lindán, trifluralín, pentachlórfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDITA TESTU

10. Na to, aby bol test platný, musí spĺňať tieto podmienky:

— priemerné vykuklenie v kontrolnej skupine musí byť na konci obdobia expozície na úrovni aspoň 70 % v obidvoch generáciách (1) (7),

— v prípade *C. riparius* a *C. yoshimatsui* by sa 85 % z celkového počtu vykuklených dospelých pakomárov z kontrolnej skupiny v obidvoch generáciách malo objaviť do 12 – 23 dní po vložení lariev v prvom instare do nádob, v prípade *C. dilutus* je prijateľné obdobie 20 – 65 dní,

— priemerný pomer pohlaví úplne vykuklených a živých dospelých jedincov (ako podiel samčekov alebo samičiek) v kontrolnej skupine v obidvoch generáciách by mal byť aspoň 0,4, ale nie vyšší ako 0,6,

— v každej chovnej klietke by počet šnúr vajíčok v kontrolných skupinách 1. generácie mal byť aspoň 0,6 na samičku pridanú do chovnej klietky,

— podiel fertilných šnúr vajíčok v každej chovnej klietke s kontrolnou skupinou 1. generácie by mal byť aspoň 0,6,

— na konci obdobia expozície pre obidve generácie je potrebné odmerať v každej nádobe pH a koncentráciu rozpusteného kyslíka. Koncentrácia kyslíka by mala predstavovať aspoň 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka (ASV ([1])) a hodnota pH nadložnej vody by mala byť v rozmedzí 6 – 9 vo všetkých testovacích nádobách,

— teplota vody by sa nemala líšiť o viac ako ± 1,0 °C.

OPIS METÓDY

Testovacie nádoby a chovné klietky

11. Larvy sa vystavia vplyvu v 600 ml sklenených kadičkách s priemerom približne 8,5 cm (pozri dodatok 5). Sú vhodné aj iné nádoby, ale musia zaručiť vhodnú hĺbku nadložnej vody a sedimentu. Povrch sedimentu by mal byť dostatočne veľký, aby poskytoval 2 – 3 cm^2 na larvu. Pomer hĺbky vrstvy sedimentu k hĺbke nadložnej vody by mal byť približne 1: 4. Mali by sa použiť chovné klietky (minimálne 30 cm vo všetkých troch rozmeroch) s gázou (veľkosť ôk približne 1 mm) aspoň na vrchu a jednej strane klietky (pozri dodatok 5). Do každej klietky sa umiestni 2 l kryštalizačná miska obsahujúca vodu použitú na testovanie a sediment na účely kladenia vajíčok. Pomer hĺbky vrstvy sedimentu k hĺbke nadložnej vody by aj v kryštalizačnej miske mal byť približne 1: 4. Po pozbieraní šnúr vajíčok z kryštalizačnej misky sa šnúry umiestnia na 12-jamkové mikrotitračné platne (jedna šnúra na jamku obsahujúcu aspoň 2,5 ml vody z obohatenej kryštalizačnej misky). Platne sa zakryjú vekom, aby sa zabránilo výraznému vyparovaniu. Možno použiť aj iné nádoby vhodné na uchovávanie šnúr vajíčok. S výnimkou mikrotitračných platní by všetky testovacie nádoby a iné prístroje, ktoré prichádzajú do styku s testovacím systémom, mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu (napr. polytetrafluóretylénu).

Výber druhov

12. Uprednostňovaným druhom na použitie v teste je *Chironomus riparius*. Možno použiť aj *C. yoshimatsui*. *C. dilutus* je takisto vhodný, ale je náročnejší na manipuláciu a vyžaduje si dlhšie trvanie testu. Podrobné údaje o kultivačných metódach pre *C. riparius* sú uvedené v dodatku 2. Informácie o kultivačných podmienkach sú k dispozícii aj pre *C. dilutus* (5) a *C. yoshimatsui* (14). Pred testovaním by sa mala potvrdiť identifikácia druhov, ale nevyžaduje sa pred každým testom ak organizmy pochádzajú z internej kultúry.

Sediment

13. Uprednostňuje sa použitie umelo pripraveného sedimentu (známeho aj pod názvom rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment). Ak sa však použije prírodný sediment, je potrebné ho charakterizovať (aspoň pH, obsah organického uhlíka, odporúča sa aj stanovenie ďalších parametrov ako pomer C/N a granulometria) a nemal by obsahovať žiadnu kontamináciu ani iné organizmy, ktoré by mohli s larvami pakomárov súperiť alebo ich požierať. Takisto sa odporúča, aby sa pred testovaním sedimenty sedem dní uvádzali do testovacích podmienok. Odporúča sa (1) (20) (21) použiť tento umelo pripravený sediment opísaný v literatúre (1):

a) 4 – 5 % (suchá hmotnosť) rašeliny: čo najbližšie k pH 5,5 – 6,0. Je dôležité použiť rašelinu v práškovej forme, jemne rozomletú (veľkosť častíc ≤1 mm) a sušenú iba vzduchom;

b) 20 % (suchá hmotnosť) kaolínu (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %);

([1]) pri teplote 20 °C za štandardného atmosférického tlaku sa hodnota ASV v sladkej vode rovná 9,1 mg/l (60 % sa rovná 5,46 mg/l).

c) 75 – 76 % (suchá hmotnosť) kremenného piesku (mal by prevládať jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 µm);

d) pridá sa deionizovaná voda, aby sa dosiahla vlhkosť konečnej zmesi v rozsahu 30 – 50 %;

e) pridá sa uhličitan vápenatý chemicky čistej kvality ($CaCO_3$), aby sa pH konečnej zmesi sedimentu upravilo na 7,0 ± 0,5;

f) obsah organického uhlíka v konečnej zmesi by mal byť 2 % (± 0,5 %) a je potrebné ho upraviť pomocou primeraného množstva rašeliny a piesku podľa písmen a) a c).

14. Zdroj rašeliny, kaolínu a piesku by mal byť známy. Je potrebné skontrolovať, či zložky sedimentu neobsahujú chemickú kontamináciu (napr. ťažké kovy, organochlórové zlúčeniny, organofosforové zlúčeniny). Príklad prípravy umelo pripraveného sedimentu je uvedený v dodatku 3. Miešanie suchých zložiek je takisto prípustné ak sa preukáže, že po pridaní nadložnej vody nedochádza k separácii zložiek sedimentu (napr. k vyplaveniu častíc rašeliny) a že rašelina alebo sediment sú v dostatočne uvedené do podmienok.

Voda

15. Každá voda, ktorá vyhovuje chemickým charakteristikám prijateľnej riediacej vody podľa zoznamu uvedeného v dodatkoch 2 a 4, je vhodná ako voda použitá na testovanie. Každá vhodná voda, prírodná voda (povrchová alebo podzemná voda), rekonštituovaná voda (pozri dodatok 2) alebo odchlórovaná voda z vodovodu sú prijateľné ako kultivačná voda a voda použitá na testovanie ak v nej pakomáre prežijú počas celej kultivácie a testovania bez známok stresu. Na začiatku testu by pH vody použitej na testovanie malo mať hodnotu 6 až 9 a celková tvrdosť by nemala byť vyššia ako 400 mg/l pre $CaCO_3$. Ak však existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou chemikáliou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nesmie použiť Elendtovo médium M4). Počas celej štúdie by sa mal používať rovnaký druh vody. Charakteristiky kvality vody uvedené v dodatku 4 by sa mali merať najmenej dvakrát za rok alebo ak existuje podozrenie, že sa tieto charakteristiky mohli významne zmeniť.

Zásobné roztoky – obohatená voda

16. a. Testované koncentrácie sa vypočítajú na základe koncentrácií vo vodnom stĺpci, t. j. vody nad sedimentom. Testovacie roztoky vybratých koncentrácií sa zvyčajne pripravujú zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky sa podľa možnosti pripravujú rozpustením testovanej chemikálie vo vode použitej na testovanie. V niektorých prípadoch môže byť na vytvorenie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku potrebné použiť rozpúšťadlá alebo disperganty. Príkladmi vhodných rozpúšťadiel sú acetón, etylénglykolmonoetyléter, etylénglykoldimetyléter, dimetylformamid a trietylénglykol. Ako disperganty možno použiť Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metylcelulózu a HCO-40. Koncentrácia solubilizačného prostriedku v konečnom testovacom médiu by mala byť minimálna (t. j. ≤ 0,1 ml/l) a mala by byť pre všetky testované koncentrácie chemikálie rovnaká. Ak sa použije solubilizačný prostriedok, nesmie mať žiadne významné účinky na prežívanie na základe porovnania kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom s negatívnou (vodnou) kontrolnou skupinou. Je však potrebné vynaložiť maximálne úsilie, aby sa predišlo použitiu takýchto materiálov.

Zásobné roztoky – obohatené sedimenty

16. b. Obohatené sedimenty vybratej koncentrácie sa zvyčajne pripravujú pridaním roztoku testovanej chemikálie priamo do sedimentu. Zásobný roztok testovanej chemikálie rozpustenej v deionizovanej vode sa zmieša s umelo pripraveným sedimentom pomocou valcovne, stroja na miešanie krmív alebo ručným miešaním. Ak je testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode, možno ju rozpustiť v čo najmenšom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. hexánu acetónu alebo chloroformu). Tento roztok sa následne zmieša s 10 g jemného kremenného piesku na každú testovaciu nádobu. Počká sa, kým sa rozpúšťadlo odparí, pričom sa musí z piesku celkom odstrániť. Piesok sa potom zmieša s vhodným množstvom sedimentu. Na rozpustenie, dispergovanie alebo emulgovanie testovanej chemikálie možno použiť iba látky, ktoré sú ľahko prchavé.

Treba mať na zreteli, že pri príprave sedimentu je nutné zohľadniť piesok, ktorý pochádza z testovanej chemikálie a pieskovej zmesi (sediment by sa teda mal pripraviť s menším množstvom piesku). Je nutné zabezpečiť, aby sa testovaná chemikália pridávaná do sedimentu v sedimente dôkladne a rovnomerne distribuovala. V prípade potreby možno na účely stanovenia stupňa homogenity analyzovať podvzorky.

KONCEPCIA TESTU

17. Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a odstup testovaných koncentrácií, počet nádob pre každú koncentráciu, počet lariev v každej nádobe, počet kryštalizačných misiek a chovných klietok. Ďalej sú opísané koncepcie na stanovenie hodnôt EC_x a NOEC a na vykonanie limitného testu.

Koncepcia regresnej analýzy

18. Účinná koncentrácia (EC_x) a koncentračný rozsah, v ktorom sa skúmajú účinky testovanej chemikálie, sa majú odmerať takým testom, aby sa sledovaný parameter neextrapoloval za hranice vytvorených údajov. Je potrebné vyhýbať sa extrapolácii pod najnižšou alebo nad najvyššou koncentráciou. Pri výbere vhodného rozsahu testovaných koncentrácií môže byť užitočný predbežný test na určenie koncentračného rozsahu testovanej látky podľa testovacej metódy C.27 alebo C.28.

19. Ak sa používa hodnota EC_x, je potrebných aspoň päť koncentrácií a osem replikátov pre každú koncentráciu. Pre každú koncentráciu je potrebné použiť dve chovné klietky (A a B). Osem replikátov sa rozdelí na dve skupiny po štyroch replikátoch pre každú chovnú klietku. Toto zlúčenie replikátov je nutné vzhľadom na počet pakomárov potrebný v klietke na presné vyhodnotenie rozmnožovania. Druhá generácia však už má zase osem replikátov, ktoré pochádzajú z populácií vystavených vplyvu v chovných klietkach. Faktor medzi koncentráciami by nemal byť väčší ako dva (v prípadoch, keď má krivka závislosti reakcie od dávky plytký sklon, možno urobiť výnimku). Počet replikátov pri každej testovanej koncentrácii chemikálie sa môže znížiť na šesť (tri na každú chovnú klietku) ak sa zvýši počet testovaných koncentrácií s rozdielnymi reakciami. Zvýšenie počtu replikátov alebo skrátenie dĺžky intervalov testovaných koncentrácií zvyčajne vedie k užším intervalom spoľahlivosti pre hodnotu EC_x.

Koncepcia odhadu NOEC

20. V prípade prístupu NOEC by sa malo použiť päť testovaných koncentrácií s minimálne ôsmimi replikátmi (štyri na každú chovnú klietku a a B) a faktor medzi koncentráciami by nemal byť väčší ako dva. Počet replikátov by mal byť dostatočný na zabezpečenie primeranej štatistickej spoľahlivosti na zistenie rozdielu 20 % oproti kontrolnej skupine na hladine významnosti 5 % (α = 0,05). V prípade miery vývinu, plodnosti a fertility je zvyčajne vhodná analýza rozptylu (ANOVA) s následným Dunnettovým testom alebo Williamsovým testom (22 – 25). V prípade pomeru vykuklenia a pomeru pohlaví môže byť vhodný Cochranov-Armitageho test, Fisherov exaktný test (s Bonferroniho korekciou) alebo Mantelov-Haentzalov test.

Limitný test

21. Môže sa vykonať limitný test (jedna testovaná koncentrácia a kontrolná/kontrolné skupina/skupiny) ak sa vo voliteľnom predbežnom teste na určenie koncentračného rozsahu testovanej látky nepozorovali žiadne účinky až po maximálnu koncentráciu. Účelom limitného testu je preukázať, že prípadné toxické účinky testovanej chemikálie sa vyskytujú pri vyššej koncentrácii ako testovaná limitná koncentrácia. V prípade vody sa odporúča 100 mg/l a v prípade sedimentu 1 000 mg/kg (suchá hmotnosť). Zvyčajne je na testovanú koncentráciu chemikálie a kontrolnú skupinu potrebných najmenej osem replikátov. Je nutné preukázať primeranú štatistickú spoľahlivosť na zistenie rozdielu 20 % od kontrolnej skupiny na hladine významnosti 5 % (α = 0,05). V prípade metrických reakcií (napr. miery vývinu) je vhodnou štatistickou metódou t-test, pokiaľ údaje spĺňajú požiadavky tohto testu (normalita, homogénne rozptyly). Ak tieto požiadavky nie sú splnené, môže sa použiť t-test s nerovnomerným rozptylom alebo neparametrický test, napríklad Wilcoxonov-Mannov-Whitheyho test. V prípade pomeru vykuklenia je vhodný Fisherov exaktný test.

POSTUP

Podmienky expozície

Príprava systému voda – sediment (obohatenie vody)

22. a. Do každej testovacej nádoby a kryštalizačnej misky sa pridá umelo pripravený sediment (pozri body 13 až 14 a dodatok 3), aby sa vytvorila vrstva hrubá aspoň 1,5 cm (v prípade kryštalizačnej misky môže byť o niečo nižšia), ale maximálne 3 cm. Voda (pozri bod 15) sa pridá tak, aby pomer hĺbky vrstvy sedimentu a hĺbky vody nepresiahol 1: 4. Po príprave testovacích nádob by sa mal systém sediment – voda nechať jemne prevzdušňovať počas približne siedmich dní pred pridaním lariev v prvom instare 1. alebo 2. generácie (pozri bod 14 a dodatok 3). Systém sediment – voda v kryštalizačných miskách sa počas testu neprevzdušňuje, lebo nie je potrebné podporovať prežívanie lariev (šnúry vajíčok sa už pred vyliahnutím pozbierali). S cieľom zabrániť separácii zložiek sedimentu a resuspendovaniu jemného materiálu počas pridávania vody použitej na testovanie do vodného stĺpca môže byť sediment v čase, keď sa naň nalieva voda, prikrytý plastovým kotúčom, ktorý sa ihneď potom odstráni. Iné zariadenia môžu byť tiež vhodné.

Príprava systému voda – sediment (obohatený sediment)

22. b. Obohatené sedimenty pripravené podľa bodu 16. b. sa umiestnia do nádob a kryštalizačnej misky, do ktorých sa pridá nadložná voda, aby sa vytvoril objemový pomer sediment – voda 1: 4. Hĺbka vrstvy sedimentu by mala byt v rozsahu 1,5 – 3 cm (v prípade kryštalizačnej misky môže byť o niečo nižšia). S cieľom zabrániť separácii zložiek sedimentu a resuspendovaniu jemného materiálu počas pridávania testovacej vody do vodného stĺpca môže byť sediment v čase, keď sa naň nalieva voda, prikrytý plastovým kotúčom, ktorý sa ihneď potom odstráni. Iné zariadenia môžu byť tiež vhodné. Keď je obohatený sediment s nadložnou vodou pripravený, je potrebné umožniť delenie testovanej chemikálie zo sedimentu do vodnej fázy (4) (5) (7) (18). To by sa podľa možnosti malo vykonať za rovnakých teplotných a prevzdušňovacích podmienok aké sa použijú v teste. Primeraný čas dosahovania rovnováhy závisí od konkrétneho sedimentu a chemikálie a môže trvať niekoľko hodín až dní a v zriedkavých prípadoch až päť týždňov. Keďže tým by sa poskytol čas na degradáciu mnohých chemikálií, na dosiahnutie rovnováhy sa nečaká, ale odporúča sa, aby obdobie dosahovania rovnováhy trvalo 48 hodín. Ak je však známe, že polčas degradácie chemikálie v sedimente bude dlhý (pozri bod 8), čas dosahovania rovnováhy sa môže predĺžiť. Na konci tohto ďalšieho obdobia dosahovania rovnováhy sa odmeria koncentrácia testovanej chemikálie v nadložnej vode, vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu a sedimente aspoň pri najvyššej koncentrácii a pri jednej nižšej koncentrácii (pozri bod 38). Tieto analytické stanovenia testovanej chemikálie umožňujú výpočet hmotnostnej bilancie a vyjadrenie výsledkov na základe meraných koncentrácií.

23. Testovacie nádoby sa zakryjú (napr. sklenenými platňami). V prípade potreby sa počas štúdie môže dopĺňať hladina vody na pôvodný objem s cieľom kompenzovať vyparovanie. Na tento účel sa použije destilovaná alebo deionizovaná voda, aby sa predišlo hromadeniu solí. Kryštalizačné misky v chovných klietkach nie sú zakryté a môže, ale nemusí byť potrebné upraviť ich s cieľom kompenzovať stratu vody počas testovacieho obdobia, lebo šnúry vajíčok sú v styku s vodou približne len jeden deň a misky sa používajú iba počas krátkej fázy testu.

Pridanie testovacích organizmov

24. Štyri až päť dní pred pridaním lariev v prvom instare 1. generácie sa z kultúry odoberú vaječné hmoty a umiestnia sa do malých nádob s kultivačných médiom. Môže sa použiť staršie médium zo zásobnej kultúry alebo čerstvo pripravené médium. V každom prípade je potrebné do kultivačného média pridať malé množstvo potravy, napr. niekoľko kvapiek filtrátu z jemne rozomletej suspenzie vločkového krmiva pre ryby (pozri dodatok 2). Použijú sa iba čerstvo nakladené vaječné hmoty. Larvy sa zvyčajne začnú liahnuť niekoľko dní po nakladení vajíčok (dva až tri dni v prípade *C. riparius* pri teplote 20 C a jeden až štyri dni v prípade *C. dilutus* pri teplote 23 °C a *C. yoshimatsui* pri teplote 25 °C) a rast lariev prebieha v štyroch instaroch, z ktorých každý trvá štyri až osem dní. V teste sa použijú larvy v prvom instare (maximálne 48 hodín po vyliahnutí). Instarové štádium lariev je potenciálne možné skontrolovať podľa šírky hlavového segmentu (7).

25. Dvadsať lariev v prvom instare 1. generácie sa pomocou tupej pipety náhodne rozdelí do jednotlivých testovacích nádob obsahujúcich systém sediment – voda. Prevzdušňovanie vody sa počas pridávania lariev do testovacích nádob preruší a zostane prerušené počas 24 hodín po pridaní lariev (pozri bod 32). Podľa použitej koncepcie testu (pozri body 19 a 20) je počet lariev použitých pri každej koncentrácii aspoň 120 (šesť replikátov na koncentráciu) v prípade použitia hodnoty EC_x a 160 v prípade prístupu NOEC (osem replikátov na koncentráciu). V koncepcii s obohateným sedimentom sa expozícia začína pridaním lariev.

Obohatenie nadložnej vody

26. Dvadsaťštyri hodín po pridaní lariev v prvom instare 1. generácie sa testovaná chemikália aplikuje do nadložného vodného stĺpca a znova sa začne s jemným prevzdušňovaním (pokiaľ ide o možné zmeny koncepcie testu, pozri bod 7). Pod povrch vody sa pomocou pipety aplikujú malé množstvá zásobných roztokov testovanej chemikálie. Nadložná voda sa potom opatrne premieša, aby sa nenarušil sediment. V koncepcii s obohatenou vodou sa expozícia začína obohatením vody (t. j. jeden deň po pridaní lariev).

Zber vykuklených dospelých jedincov

27. Vykuklené pakomáre 1. generácie sa z testovacích nádob zbierajú aspoň raz, ale podľa možnosti dvakrát denne (pozri bod 36) s použitím odsávačky, exhaustora alebo podobného zariadenia (pozri dodatok 5). Treba dbať najmä na to, aby sa dospelé jedince nepoškodili. Pozbierané pakomáre zo štyroch testovacích nádob z jednej skupiny s aplikovanou chemikáliou sa vypustia do chovnej klietky, do ktorej boli vopred pridelené. V deň prvého vykuklenia (samčekov) sa do kryštalizačných misiek pipetou aplikuje malý objem zásobného roztoku testovanej chemikálie pod vodnú hladinu (koncepcia s obohatenou vodou). Nadložná voda sa potom opatrne premieša, aby sa nenarušil sediment. Koncentrácia testovanej chemikálie v kryštalizačnej miske je nominálne rovnaká ako v nádobách s aplikovanou chemikáliou, ktoré sú priradené k danej chovnej klietke. V prípade koncepcie s obohateným sedimentom sa kryštalizačné misky pripravia približne na 11. deň po začatí expozície (t. j. po pridaní lariev 1. generácie), aby mohlo dôjsť k dosihnutiu rovnováhy počas približne 48 hodín pred nakladením prvých šnúr vajíčok.

28. Šnúry vajíčok sa pozbierajú z kryštalizačnej misky v chovnej klietke pomocou pinzety alebo tupej pipety. Každá šnúra vajíčok sa umiestni do nádoby obsahujúcej kultivačné médium z kryštalizačnej misky, z ktorej bola odobratá (napr. do jamky v 12-jamkovej mikrotitračnej platni aspoň s 2,5 ml média). Nádoby so šnúrami vajíčok sa zakryjú vekom, aby sa zabránilo výraznému vyparovaniu. Šnúry vajíčok sa uchovávajú na pozorovanie aspoň šesť dní po tom ako sa nakladú, aby sa mohli klasifikovať ako fertilné alebo nefertilné.

Na účely začiatku 2. generácie sa aspoň tri, ale radšej šesť fertilných šnúr vajíčok vyberie z každej chovnej klietky, pridá sa trocha potravy a nechá sa vyliahnuť. Tieto šnúry vajíčok by mali byť nakladené na vrchole obdobia kladenia vajíčok, ktorý sa v kontrolných skupinách za normálnych okolností vyskytuje okolo 19. dňa testu. V ideálnom prípade sa 2. generácia pre všetky skupiny s aplikovanou chemikáliou začína v ten istý deň, ale v dôsledku účinkov súvisiacich s chemikáliou na vývin lariev to nie je vždy možné. V takom prípade sa 2. generácie pre vyššie koncentrácie môžu začať neskôr ako pre nižšie koncentrácie a kontrolnú skupinu (s rozpúšťadlom).

29. a. V prípade koncepcie s obohatenou vodou sa systém sediment – voda pre 2. generáciu pripraví aplikovaním testovanej chemikálie do nadložného vodného stĺpca približne 1 hodinu pred pridaním lariev v prvom instare do testovacích nádob. Pod povrch vody sa pomocou pipety aplikujú malé množstvá roztokov testovanej chemikálie. Nadložná voda sa potom opatrne premieša, aby sa nenarušil sediment. Po obohatení sa začne mierne prevzdušňovanie.

29. b. V prípade koncepcie s obohateným sedimentom sa expozičné nádoby obsahujúce systém sediment – voda pre 2. generáciu pripravia rovnakým spôsobom ako v prípade 1. generácie.

30. Dvadsať lariev v prvom instare (maximálne 48 hod. po vyliahnutí) 2. generácie sa pomocou tupej pipety náhodne rozdelí do jednotlivých testovacích nádob obsahujúcich systém obohatený sediment – voda.

Prevzdušňovanie vody by sa počas pridávania lariev v prvom instare do testovacích nádob malo prerušiť a malo by zostať prerušené počas ďalších 24 hodín po pridaní lariev. Podľa použitej koncepcie testu (pozri body 19 a 20) je počet lariev použitých pri každej koncentrácii aspoň 120 (šesť replikátov na koncentráciu) v prípade použitia hodnoty EC_x a 160 v prípade prístupu NOEC (osem replikátov na koncentráciu).

Potrava

31. Je nevyhnutné, aby sa larvy v testovacích nádobách kŕmili podľa možnosti každý deň alebo najmenej trikrát do týždňa. V prvých desiatich dňoch vývinu je pre mladé larvy vhodné krmivo pre ryby (suspenzia vo vode alebo jemne rozomletá potrava, napr. Tetra-Min alebo Tetra-Phyll, bližšie informácie pozri v dodatku 2) v dennom množstve 0,25 – 0,5 mg (0,35 – 0,5 mg pre *C. yoshimatsui*) na jednu larvu. Pre staršie larvy môže byť potrebné o niečo väčšie množstvo potravy: denné množstvo 0,5 – 1,0 mg na jednu larvu by malo po zvyšok testu postačovať. Ak sa pozoruje rast plesní alebo ak sa v kontrolných nádobách pozoruje úmrtnosť, prídel potravy by sa mal vo všetkých testovacích a kontrolných nádobách znížiť. Ak nie je možné vznik plesní zastaviť, test je potrebné zopakovať.

Toxikologický význam expozície prostredníctvom požitia je vo všeobecnosti vyšší v prípade chemikálií s vysokou afinitou k organickému uhlíku alebo chemikálií, ktoré sa kovalentne viažu na sediment. Preto sa pri testovaní chemikálií s týmito vlastnosťami môže do umelo pripraveného sedimentu pred stabilizačným obdobím pridať množstvo potravy potrebné na zabezpečenie prežitia a prirodzeného rastu lariev v závislosti od regulačných požiadaviek. S cieľom predísť zhoršeniu kvality vody sa má namiesto krmiva pre ryby použiť rastlinný materiál, napr. sa môže pridať 0,5 % (suchá hmotnosť) jemne rozomletých listov pŕhľavy dvojdomej (*Urtica dioica*), moruše (*Morus alba*), ďateliny plazivej (*Trifolium repens*), špenátu (*Spinacia oleracea*) alebo iného rastlinného materiálu (*Cerophyl* alebo *α*-celulóza). Pridanie celej dávky zdroja organickej potravy do sedimentu pred obohatením nie je triválne, pokiaľ ide o kvalitu vody a biologické vlastnosti (21) ani nejde o štandardizovanú metódu, no z posledných štúdií vyplýva, že táto metóda funguje (19) (26). Dospelé pakomáre v chovnej klietke normálne nepotrebujú žiadne kŕmenie, ale plodnosť a fertilita sa zvýšia, keď sa ako zdroj potravy pre vykuklené dospelé jedince použije vatový tampón napustený nasýteným sacharózovým roztokom (34).

Podmienky inkubácie

32. Po 24 hodinách od pridania lariev v prvom instare obidvoch generácií sa zabezpečí jemné prevzdušňovanie nadložnej vody v testovacích nádobách a pokračuje sa v ňom počas celého testu (treba dbať na to, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesla pod 60 % ASV). Prevzdušňovanie sa zabezpečí pomocou sklenenej Pasteurovej pipety, ktorej vývod sa upevní 2 – 3 cm nad vrstvou sedimentu tak, aby bol prietok niekoľko bublín za sekundu. Ak sa testujú prchavé chemikálie, je potrebné zvážiť možnosť, že systém sediment – voda sa nebude prevzdušňovať, zároveň sa však musí splniť kritérium validity minimálne 60 % ASV (bod 10). Ďalšie usmernenia sa nachádzajú v literatúre (16).

33. Test s *C. riparius* sa vykonáva pri konštantnej teplote 20 °C (± 2 °C). V prípade *C. dilutus* a *C. yoshimatsui* sa odporúča teplota 23 °C, resp. 25 °C (± 2 °C). Použije sa 16-hodinová fotoperióda, pričom intenzita svetla by mala byť 500 – 1 000 luxov. V chovných klietkach možno navyše pridať jednohodinovú fázu úsvitu a súmraku.

Trvanie expozície

34. Koncepcia s obohatenou vodou: obdobie expozície 1. generácie sa začína, keď sa testovaná chemikália aplikuje do nadložnej vody v testovacej nádobe (čo je jeden deň po vložení lariev – pokyny na možné zmeny koncepcie expozície sa nachádzajú v bode 7). Expozícia 2. generácie lariev sa začína ihneď, lebo sa vkladajú do systému sediment – voda, ktorý už bol obohatený. Maximálne trvanie expozície pre 1. generáciu je 27 dní a pre 2. generáciu 28 dní (larvy 1. generácie strávia jeden deň v nádobách bez expozície) v prípade *C. riparius* a *C. yoshimatsui*. Vzhľadom na prekrývanie je celkové trvanie testu približne 44 dní. V prípade *C. dilutus* je maximálne trvanie expozície 64 dní pre 1. generáciu a 65 dní pre 2. generáciu. Celkové trvanie je približne 100 dní.

Koncepcia s obohateným sedimentom: expozícia sa začína pridaním lariev a trvá maximálne 28 dní pre obe generácie v prípade *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a maximálne 65 dní pre obe generácie v prípade *C. dilutus*.

Pozorovania

Vykuklenie

35. Určí sa čas vývinu a celkový počet úplne vykuklených a živých samčích a samičích pakomárov pre obidve generácie. Samčekovia sa ľahko identifikujú podľa obrvených tykadiel a tenkého tela.

36. Testovacie nádoby pre obidve generácie je potrebné pozorovať najmenej trikrát do týždňa s cieľom vizuálne vyhodnotiť každé abnormálne správanie lariev (napr. opustenie sedimentu, nezvyčajné plávanie) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Počas obdobia vykuklovania, ktoré v prípade *C. riparius* a *C. yoshimatsui* začína približne 12 dní po vložení lariev (20 dní v prípade *C. dilutus*), sa vykuklené pakomáre aspoň raz, ale podľa možnosti dvakrát denne (skoro ráno a neskoro popoludní) spočítajú a určí sa ich pohlavie. Po identifikácii sa pakomáre 1. generácie opatrne vyberú z nádob a prenesú do chovnej klietky. Pakomáre 2. generácie sa po identifikácii vyberú a usmrtia. Všetky šnúry vajíčok 1. generácie nakladené v testovacích nádobách sa majú jednotlivo pozbierať a preniesť aspoň s 2,5 ml natívnej vody na 12-jamkové mikrotitračné platne (alebo iné vhodné nádoby) zakryté vekom, aby sa zabránilo výraznému vyparovaniu. Zaznamená sa tiež počet mŕtvych lariev a viditeľných kukiel, ktoré sa nevykuklili. Príklady chovnej klietky, testovacej nádoby a exhaustora sú uvedené v dodatku 5.

Rozmnožovanie

37. Účinky na rozmnožovanie sa posudzujú na základe počtu šnúr vajíčok vyprodukovaných 1. generáciou pakomárov a fertility týchto šnúr vajíčok. Raz denne sa šnúry vajíčok pozbierajú z kryštalizačnej misky, ktorá je umiestnená v každej chovnej nádobe. Šnúry vajíčok sa majú pozbierať a preniesť aspoň s 2,5 ml natívnej vody na 12-jamkovú mikrotitračnú platňu (jedna šnúra vajíčok do každej jamky) alebo iných vhodných nádob zakrytých vekom, aby sa zabránilo výraznému vyparovaniu. Pre každú šnúru vajíčok sa zdokumentujú tieto vlastnosti: deň produkcie, veľkosť (normálna, t. j. 1,0 cm ± 0,3 cm alebo malá, zvyčajne ≤ 0,5 cm), štruktúra (normálna = tvar banánu so špirálovou šnúrou vajíčok alebo abnormálna, napr. šnúra vajíčok bez špirály) a fertilita (fertilná alebo nefertilná). V priebehu šiestich dní po nakladení sa vyhodnotí fertilita šnúry vajíčok. Šnúra vajíčok sa považuje za fertilnú, keď sa vyliahne aspoň jedna tretina vajíčok. Celkový počet samičiek pridaných do chovnej klietky sa použije na výpočet počtu šnúr vajíčok na samičku a počtu fertilných šnúr vajíčok na samičku. Ak to je potrebné, počet vajíčok na šnúru vajíčok možno odhadnúť nedeštruktívnym spôsobom pomocou kruhovej metódy počítania (opísanej v odkazoch 32 a 33).

Analytické merania

Koncentrácia testovanej chemikálie

38. Vzorky nadložnej vody, vody nachádzajúcej sa v póroch sedimentu a sedimentu sa majú analyzovať minimálne na začiatku expozície (v prípade obohacovania vody najlepšie jednu hodinu po aplikácii) a na konci testu a to pri najvyššej koncentrácii a jednej nižšej koncentrácii. Vzťahuje sa to na nádoby s obidvoma generáciami. Z kryštalizačných misiek v chovnej klietke sa analyzuje len nadložná voda, lebo práve s ňou prichádzajú do styku šnúry vajíčok (v prípade koncepcie s obohateným sedimentom možno zvážiť analytické potvrdenie koncentrácie v sedimente). Podľa potreby možno počas testu vykonať aj ďalšie merania sedimentu, vody nachádzajúcej sa v póroch sedimentu a nadložnej vody. Tieto stanovenia koncentrácie testovanej chemikálie poskytujú informácie o správaní/delení testovanej chemikálie v systéme voda – sediment. Odoberanie vzoriek sedimentu a vody nachádzajúcej sa v póroch sedimentu na začiatku a počas testu (pozri bod 39) si vyžaduje ďalšie testovacie nádoby na vykonanie analytických stanovení. Merania v sedimente v prípade koncepcie s obohatenou vodou nemusia byť potrebné ak sa delenie testovanej chemikálie medzi vodu a sediment jednoznačne určilo v štúdii voda/sediment pri porovnateľných podmienkach (napr. pomer sedimentu k vode, druh aplikácie, obsah organického uhlíka v sedimente) alebo ak sa preukáže, že namerané koncentrácie v nadložnej vode zostávajú v rozsahu 80 – 120 % nominálnych alebo nameraných prvotných koncentrácií.

39. Ak sa vykonajú prostredné merania (napr. v 7. a/alebo 14. deň) a ak sú na analýzu potrebné veľké vzorky, ktoré nemožno odobrať z testovacích nádob bez ovplyvnenia testovacieho systému analytické stanovenia je potrebné vykonať na vzorkách z ďalších testovacích nádob, s ktorými sa zaobchádzalo rovnakým spôsobom (vrátane prítomnosti testovacích organizmov), ale ktoré sa nepoužili na biologické pozorovania.

40. Na izolovanie intersticiálnej (= pórovej) vody je odporúčaným postupom centrifugácia napr. pri 10 000 g a 4 °C počas 30 minút. Ak sa však preukáže, že testovaná chemikália sa na filtroch neadsorbuje, môže byť prijateľná aj filtrácia. V niektorých prípadoch nemusí byť možné analyzovať koncentrácie vo vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu, lebo objem vzorky môže byť príliš malý.

Fyzikálno-chemické parametre

41. Je potrebné vhodným spôsobom odmerať pH, rozpustený kyslík v testovacej vode a teplotu vody v testovacích nádobách a kryštalizačných miskách (pozri bod 10). Tvrdosť a amoniak sa merajú v kontrolných nádobách a v jednej testovacej nádobe a kryštalizačnej miske pri najvyššej koncentrácii na začiatku a na konci testu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

42. Účelom tohto testu životného cyklu je stanoviť účinok testovanej chemikálie na rozmnožovanie a mieru vývinu a celkový počet úplne vykuklených a živých samčekov a samičiek pakomárov pre dve generácie. Na účely stanovenia pomeru vykuklenia sa údaje pre samčekov a samičky majú spojiť. Ak neexistujú žiadne štatisticky významné rozdiely medzi pohlaviami v citlivosti z hľadiska miery vývinu, výsledky pre samčekov a samičky možno na účely štatistickej analýzy spojiť.

43. Účinné koncentrácie vyjadrené ako koncentrácie v nadložnej vode (v prípade obohatenej vody) alebo sedimente (v prípade obohateného sedimentu) sa zvyčajne vypočítajú na základe nameraných koncentrácií na začiatku expozície (pozri bod 38). Preto sa v prípade obohatenej vody vypočíta priemer koncentrácií, ktoré sa zvyčajne merajú na začiatku expozície v nadložnej vode nádob pre obidve generácie a v kryštalizačných miskách, pre každú testovanú koncentráciu. V prípade obohateného sedimentu sa vypočíta priemer koncentrácií, ktoré sa zvyčajne merajú na začiatku expozície v nádobách pre obidve generácie (a voliteľne aj v kryštalizačných miskách), pre každú testovanú koncentráciu.

44. Na vypočítanie bodového odhadu, t. j. EC_x, sa ako pravé replikáty môžu použiť štatistické údaje na jednu nádobu alebo na jednu chovnú klietku. Pri výpočte intervalu spoľahlivosti pre každú hodnotu EC_x je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami alebo je nutné preukázať, že táto variabilita je taká malá, že ju možno ignorovať. Ak sa zodpovedajúci model vypočíta metódou najmenších štvorcov, v štatistike na jednu nádobu je potrebné aplikovať transformáciu, aby sa zlepšila homogenita rozptylu. Hodnoty EC_x by sa však mali vypočítať po tom ako sa reakcia transformuje naspäť na pôvodnú hodnotu (31).

45. Ak je cieľom štatistickej analýzy určenie NOEC prostredníctvom testovania hypotézy, je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami, čo zaručuje použitie metód analýzy ANOVA (napr. postupmi Williamsovho testu a Dunnettovho testu). Williamsov test je vhodný v prípadoch, keď sa teoreticky očakáva monotónny priebeh krivky závislosti dávka-odpoveď a Dunnettov test je vhodný v prípadoch, keď sa hypotéza o monotónnosti nepotvrdí. Alternatívne môžu byť v prípadoch, keď sa nedodržia zvyčajné predpoklady analýzy ANOVA (31), vhodné robustnejšie testy (27).

Pomer vykuklenia

46. Pomery vykuklenia sú kvantové údaje a môžu sa analyzovať pomocou Cochranovho-Armitageho testu aplikovaného zostupne v prípadoch, keď sa očakáva monotónny priebeh krivky závislosti dávka-odpoveď a tieto údaje zodpovedajú tomuto očakávaniu. Ak to tak nie je, možno použiť Fisherov exaktný test alebo Mantzelov-Haentzalov test s Bonferroniho-Holmovou úpravou hodnôt p. Ak sa medzi replikátmi s rovnakou koncentráciou preukáže väčšia variabilita, než akej by nasvedčovala binomická distribúcia (často sa uvádza ako ‚extra-binomická' variácia), potom by sa mal použiť robustný Cochranov-Armitageho test alebo Fisherov exaktný test ako sa navrhuje v bode (27).

Určí sa súčet živých pakomárov (samčekov plus samičiek) vykuklených na nádobu n_e a vydelí sa počtom pridaných lariev na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kde:

ER = pomer vykuklenia,

n_e = počet živých pakomárov vykuklených na nádobu,

n_a = počet pridaných lariev na nádobu (zvyčajne 20).

Ak je hodnota n_e vyššia ako hodnota n_a (t. j. keď sa neúmyselne pridalo viac lariev ako plánovaný počet), mala by sa použiť hodnota n_a rovná n_e.

47. Najvhodnejším alternatívnym prístupom pri veľkých vzorkách v prípadoch extra-binomickej variácie je brať pomer vykuklenia ako spojitú reakciu a použiť postupy zodpovedajúce týmto údajom o *ER*. Za veľkú vzorku sa tu pokladá vzorka, v ktorej je počet vykuklených aj počet nevykuklených jedincov v každom replikáte (nádobe) vyšší ako päť.

48. Pri použití metód ANOVA je potrebné najskôr transformovať hodnoty *ER* pomocou arkussínusovej transformácie druhej odmocniny alebo Tukeyho-Freemanovej transformácie s cieľom získať približnú normálnu distribúciu a vyrovnať rozptyly. Cochranov-Armitageho test, Fisherov exaktný (Bonferroniho) test alebo Mantelov-Haentzalov test možno aplikovať ak sa použijú absolútne frekvencie. Arkussínusová transformácia druhej odmocniny sa aplikuje pomocou prevrátenej hodnoty sínusu ($\sin^{-1}$) druhej odmocniny *ER*.

49. Hodnoty EC_x pre pomery vykuklenia sa vypočítajú pomocou regresnej analýzy [napr. pomocou modelov probit, logit alebo Weibull (28)]. Ak je regresná analýza neúspešná (napr. ak sú menej ako dve čiastkové reakcie), možno použiť iné neparametrické metódy, napríklad metódu pohyblivého priemeru alebo jednoduchú interpoláciu.

Miera vývinu

50. Priemerný čas vývinu predstavuje priemerné časové rozpätie medzi pridaním lariev (0. deň testu) a vykuklením pokusnej kohorty pakomárov (pri výpočte reálneho času vývinu sa zohľadní vek lariev v čase pridania). Miera vývinu (jednotka: 1/deň) je prevrátená hodnota času vývinu a predstavuje časť vývinu lariev, ktorá prebehne za deň. Pri hodnotení týchto štúdií toxicity v sedimente sa uprednostňuje miera vývinu, lebo jej rozptyl je nižší a v porovnaní s časom vývinu je homogénnejší a bližší normálnej distribúcii. S mierou vývinu teda možno použiť výkonnejšie parametrické testovacie postupy ako s časom vývinu. Pre mieru vývinu ako spojitú reakciu možno hodnoty EC_x odhadnúť pomocou regresnej analýzy [napr. (29), (30)]. NOEC pre priemernú mieru vývinu možno stanoviť metódami ANOVA, napr. Williamsovým testom alebo Dunnettovým testom. Keďže samčekovia sa vykuklia skôr ako samičky, t. j. majú vyššiu mieru vývinu, je vhodné okrem hodnoty pre všetky pakomáre vypočítať mieru vývinu pre každé pohlavie oddelene.

51. Pri štatistických testoch sa predpokladá, že počet pakomárov pozorovaných v kontrolnom dni x sa vykuklil v priemernom časovom intervale medzi dňom x a dňom x − l (l = dĺžka kontrolného intervalu, zvyčajne jeden deň). Priemerná miera vývinu na nádobu ($\overline{x}$) sa vypočíta podľa tejto rovnice:

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

kde:

$\bar{x}$: je priemerná miera vývinu na nádobu,

i: index kontrolného intervalu,

m: maximálny počet kontrolných intervalov,

f_i: počet pakomárov vykuklených v kontrolnom intervale i,

n_e: celkový počet pakomárov vykuklených na konci pokusu (= Σf_i)

x_i: miera vývinu pakomárov vykuklených v intervale i,

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

kde:

deň_i: kontrolný deň (počet dní od pridania lariev),

l_i: dĺžka kontrolného intervalu i (dni, zvyčajne jeden deň).

Pomer pohlaví

52. Pomery pohlaví sú kvantové údaje a preto by sa mali hodnotiť prostredníctvom Fisherovho exaktného testu alebo iných vhodných metód. Prirodzený pomer pohlaví *C. riparius* je jeden, t. j. samčekovia a samičky sú rovnako zastúpené. Pre obidve generácie sa údaje o pomere pohlaví majú spracovať rovnako. Keďže maximálny počet pakomárov na nádobu (t. j. 20) je príliš nízky na zmysluplné štatistické analýzy, vypočíta sa súčet celkového počtu úplne vykuklených a živých pakomárov pre každé pohlavie vo všetkých nádobách pre jednu testovanú koncentráciu chemikálie. Tieto netransformované údaje sa otestujú proti kontrolnej skupine (s rozpúšťadlom) alebo spojeným údajom z kontrolných skupín v kontingenčnej tabuľke 2 × 2.

Rozmnožovanie

53. Rozmnožovanie ako plodnosť sa vypočíta ako počet šnúr vajíčok na samičku. Konkrétnejšie, celkový počet šnúr vajíčok nakladených v chovnej klietke sa vydelí celkovým počtom živých a nepoškodených samičiek pridaných do tejto klietky. NOEC pre plodnosť možno stanoviť metódami ANOVA, napr. Williamsovým testom alebo Dunnettovým testom.

54. Fertilita šnúr vajíčok sa použije na kvantifikáciu počtu fertilných šnúr vajíčok na samičku. Celkový počet fertilných šnúr vajíčok nakladených v chovnej klietke sa vydelí celkovým počtom živých a nepoškodených samičiek pridaných do tejto klietky. NOEC pre fertilitu možno stanoviť metódami ANOVA, napr. Williamsovým testom alebo Dunnettovým testom.

Protokol o skúške

55. Protokol o skúške by mal obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti [rozpustnosť vo vode, tlak pary, log K_{ow}, rozdeľovacia konštanta v pôde (alebo v sedimente ak je k dispozícii), stabilita vo vode a v sedimente atď.],

— chemické identifikačné údaje (bežný názov, chemický názov, štrukturálny vzorec, číslo CAS atď.) vrátane čistoty a analytickej metódy kvantifikácie testovanej chemikálie.

Testovacie druhy:

— použité testovacie organizmy: druh, vedecký názov, zdroj organizmov a podmienky chovu,

— informácie o manipulácii s vaječnou hmotou a larvami,

— informácie o manipulácii s vykuklenými dospelými jedincami 1. generácie s použitím exhaustora atď. (pozri dodatok 5),

— vek testovacích organizmov 1. a 2. generácie v čase vloženia do testovacích nádob.

Podmienky testu:

— použitý sediment, t. j. prírodný alebo umelo pripravený (umelý) sediment,

— prírodný sediment: poloha a opis miesta odobratia vzoriek sedimentu vrátane histórie kontaminácie ak je to možné, charakteristiky sedimentu: pH, obsah organického uhlíka, pomer C/N a granulometria (podľa potreby),

— umelo pripravený sediment: príprava, zložky a charakteristiky (obsah organického uhlíka, pH, vlhkosť atď. odmerané na začiatku testu),

— príprava vody použitej na testovanie (ak sa použije rekonštituovaná voda) a charakteristiky (koncentrácia kyslíka, pH, tvrdosť atď. odmerané na začiatku testu),

— hĺbka sedimentu a nadložnej vody v testovacích nádobách a kryštalizačných miskách,

— objem nadložnej vody a vody nachádzajúcej sa v póroch sedimentu, hmotnosť mokrého sedimentu s vodou nachádzajúcou sa v póroch sedimentu a bez nej pre testovacie nádoby a kryštalizačné misky,

— testovacie nádoby (materiál a veľkosť),

— kryštalizačné misky (materiál a veľkosť),

— chovné klietky (materiál a veľkosť),

— metóda prípravy zásobných roztokov a testovacie koncentrácie pre testovacie nádoby a kryštalizačné misky,

— aplikácia testovanej chemikálie do testovacích nádob a kryštalizačných misiek: testované koncentrácie, počet replikátov a prípadné rozpúšťadlá ak sú potrebné,

— inkubačné podmienky v testovacích nádobách: teplota, cyklus a intenzita svetla, prevzdušňovanie (počet bubliniek za sekundu),

— inkubačné podmienky v chovných klietkach a kryštalizačných miskách: teplota, cyklus a intenzita svetla,

— inkubačné podmienky pre šnúry vajíčok na mikrotitračných platniach (alebo iných nádobách): teplota, cyklus a intenzita svetla,

— podrobné informácie o kŕmení vrátane druhu potravy, prípravy, množstva a kŕmneho režimu.

Výsledky:

— nominálne testované koncentrácie, namerané testované koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách a kryštalizačných miskách,

— kvalita vody v testovacích nádobách a kryštalizačných miskách, t. j. pH, teplota, rozpustený kyslík, tvrdosť a amoniak,

— doplnenie prípadnej vyparenej vody použitej na testovanie v testovacích nádobách,

— počet vykuklených samčích a samičích pakomárov na nádobu na deň pre 1. a 2. generáciu,

— pomer pohlaví úplne vykuklených a živých pakomárov na testovanú koncentráciu pre 1. a 2. generáciu,

— počet lariev na nádobu, ktoré sa nevykuklili ako pakomáre, pre 1. a 2. generáciu,

— percento/podiel vykuklených jedincov na replikát a testovanú koncentráciu (samičky a samčekovia pakomárov spolu) pre 1. a 2. generáciu,

— priemerná miera vývinu úplne vykuklených a živých pakomárov na replikát a testovanú koncentráciu (samičky a samčekovia pakomárov samostatne i spolu) pre 1. a 2. generáciu,

— počet šnúr vajíčok uložených v kryštalizačných miskách na chovnú klietku a deň,

— vlastnosti každej šnúry vajíčok (veľkosť, tvar a fertilita),

— plodnosť – celkový počet šnúr vajíčok na celkový počet samičiek pridaných do chovnej klietky,

— fertilita – celkový počet fertilných šnúr vajíčok na celkový počet samičiek pridaných do chovnej klietky,

— odhady sledovaných parametrov toxicity, napr. EC_x (a súvisiace intervaly spoľahlivosti), NOEC a štatistické metódy použité na jej stanovenie,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

1. Kapitola C.28 tejto prílohy, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked water.

2. Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. a M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic Chironomus (Camptochironomus) tentans Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311 – 322.

3. Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738 august 1994. WRc, Spojené kráľovstvo.

4. SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

5. ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

6. Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, december 1997.

7. US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

8. US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

9. US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

10. Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. a R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

11. Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. a 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. a 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. Kapitola C.27 tejto prílohy, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment.

16. OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paríž.

17. Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. a M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

18. Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, september 1995.

19. Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. a 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. a J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163 – 1175.

21. Naylor, C. a C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291 – 3303.

22. Dunnett, C.W. (1964) a multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096 – 1121.

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

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

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

26. Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. a 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. a 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. a D.J. Versteeg (1992) a statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485 – 1494.

30. Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298 – 312.

31. OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, s. 146, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paríž.

32. Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. a 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. a J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge Chironomus riparius (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1 – 9.

34. OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paríž.

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov:

Chemikália je látka alebo zmes.

Umelo pripravený sediment alebo rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment je zmes materiálov použitých na napodobnenie fyzických zložiek prírodného sedimentu.

Nadložná voda je voda umiestnená v testovacej nádobe nad sedimentom.

Intersticiálna voda alebo voda nachádzajúca sa v póroch sedimentu je voda nachádzajúca sa v priestore medzi časticami sedimentu a pôdy.

Obohatená voda je voda použitá na testovanie, do ktorej bola pridaná testovaná chemikália.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Dodatok 2

Odporúčania na kultiváciu *Chironomus riparius*

1. Larvy *Chironomus* sa môžu chovať v kryštalizačných miskách alebo vo väčších nádobách. Na dno nádoby sa nanesie tenká vrstva jemného kremenného piesku vo výške 5 – 10 mm. Je preukázané, že vhodným substrátom je aj diatomit (napr. Merck, položka 8117) (postačuje tenšia vrstva do výšky len niekoľkých milimetrov). Potom sa pridá vhodná voda do výšky niekoľkých centimetrov. Hladina vody by sa mala podľa potreby dolievať, aby sa doplnila strata vyparením a aby sa predišlo vysychaniu. Vodu je možné v prípade potreby vymeniť. Je potrebné zabezpečiť jemné prevzdušňovanie. Nádoby na chov lariev by mali byť umiestnené vo vhodnej klietke, ktorá zabráni úniku vykuklených dospelých jedincov. Klietka by mala byť dostatočne veľká, aby umožňovala rojenie vykuklených dospelých jedincov, v opačnom prípade by nemuselo dôjsť ku kopulácii (minimálna veľkosť je približne 30 × 30 × 30 cm).

2. Klietky je potrebné udržiavať pri izbovej teplote alebo v miestnosti so stálym prostredím pri teplote 20 ± 2 °C s fotoperiódou 16 hodín svetla (intenzita približne 1 000 luxov) a 8 hodín tmy. Uvádza sa, že vlhkosť vzduchu nižšia ako 60 % RH môže brániť rozmnožovaniu.

Riediaca voda

3. Možno použiť akúkoľvek vhodnú prírodnú alebo syntetickú vodu. Bežne sa používa studňová voda, odchlórovaná voda z vodovodu a umelé médiá (napr. Elendtovo médium ‚M4' alebo ‚M7', pozri ďalej). Pred použitím je potrebné vodu prevzdušniť. V prípade potreby možno kultivačnú vodu obnoviť opatrným odliatím alebo odčerpaním použitej vody z kultivačných nádob bez toho, aby sa poškodili trubice lariev.

Kŕmenie lariev

4. Larvy rodu *Chironomus* sa kŕmia vločkovým krmivom pre ryby (TetraMin®, TetraPhyll® alebo inou podobnou chránenou značkou krmiva pre ryby) v približnom množstve 250 mg na nádobu na deň. Krmivo sa môže podávať ako suchý rozomletý prášok alebo ako suspenzia vo vode: 1,0 g vločkového krmiva sa pridá do 20 ml riediacej vody a premieša sa, aby sa získala homogénna zmes. Tento prípravok sa môže podávať v množstve približne 5 ml na nádobu na deň (pred použitím pretrepať). Staršie larvy môžu dostávať viac.

5. Kŕmenie sa upraví podľa kvality vody. Ak sa kultivačné médium zakalí, kŕmenie je potrebné obmedziť. Prídavky do krmiva je potrebné starostlivo monitorovať. Nedostatok potravy spôsobí, že larvy sa budú presúvať k vodnému stĺpcu a prebytok potravy spôsobí zvýšenie činnosti mikróbov a zníženie koncentrácie kyslíka. V obidvoch prípadoch môže dôjsť k zníženiu rýchlosti rastu.

6. Pri založení nových kultivačných nádob sa môžu pridať aj bunky niektorých zelených rias (napr. *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*).

Kŕmenie vykuklených dospelých jedincov

7. Z niektorých pokusov vyplýva, že ako potrava pre vykuklené dospelé jedince môže slúžiť vatový tampón napustený nasýteným sacharózovým roztokom.

Vykuklenie

8. Pri teplote 20 ± 2 °C sa dospelé jedince začnú vykuklovať z nádob na chov lariev po približne 13 – 15 dňoch. Samčekovia sa ľahko rozpoznajú podľa obrvených tykadiel a tenkého tela.

Vaječné hmoty

9. Keď sú v chovnej klietke prítomné dospelé jedince, vo všetkých nádobách na chov lariev je potrebné trikrát do týždňa kontrolovať kladenie želatínových vaječných hmôt. Ak sú vaječné hmoty prítomné, opatrne sa odoberú. Mali by sa preniesť na malú misku so vzorkou kultivačnej vody. Vaječné hmoty sa použijú na založenie nových kultivačných nádob (napr. dve až štyri vaječné hmoty na nádobu) alebo sa použijú v testoch toxicity.

10. Larvy prvého instaru by sa mali vyliahnuť po dvoch až troch dňoch.

Založenie nových kultivačných nádob

11. Po vytvorení kultúr by malo byť možné založiť novú nádobu na kultiváciu lariev každý týždeň alebo menej často v závislosti od testovacích požiadaviek, pričom staršie nádoby sa po vykuklení dospelých pakomárov odstránia. Týmto spôsobom sa pri minimálnom riadení zabezpečí pravidelné doplňanie dospelých jedincov.

Príprava testovacích roztokov ‚M4' a ‚M7'

12. Elendt (1990) opísal médium ‚M4'. Médium ‚M7' sa pripravuje ako médium ‚M4' s výnimkou látok uvedených v tabuľke 1, ktorých koncentrácie v médiu ‚M7' sú štyrikrát nižšie ako v médiu ‚M4'. Testovací roztok by sa nemal pripraviť podľa Elendta a Biasa (1990), lebo uvedené koncentrácie $NaSiO_3$, $5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 na prípravu zásobných roztokov nie sú vhodné.

Príprava média ‚M7'

13. Každý zásobný roztok (I) sa pripraví jednotlivo a kombinovaný zásobný roztok (II) sa pripraví z týchto zásobných roztokov (I) (pozri tabuľku 1). Na prípravu média ‚M7' sa 50 ml z kombinovaného zásobného roztoku (II) a množstvá každého makronutričného zásobného roztoku uvedené v tabuľke 2 doplnia do 1 litra deionizovanej vody. Vitamínový zásobný roztok sa pripraví pridaním troch vitamínov do deionizovanej vody, ako je uvedené v tabuľke 3 a krátko pred použitím sa do konečného média ‚M7' pridá 0,1 ml kombinovaného vitamínového zásobného roztoku. Vitamínový zásobný roztok sa skladuje zmrazený v malých alikvotných častiach. Médium sa prevzdušňuje a stabilizuje.

Tabuľka 1

Zásobné roztoky stopových prvkov pre médiá M4 a M7

Zásobné roztoky (I)	Množstvo (mg) doplnené do 1 litra deionizovanej vody	Príprava kombinovaného zásobného roztoku (II): zmiešajte tieto množstvá (ml) zásobných roztokov (I) a doplňte do 1 litra deionizovanej vody		Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004

Zásobné roztoky (I)	Množstvo (mg) doplnené do 1 litra deionizovanej vody	Príprava kombinovaného zásobného roztoku (II): zmiešajte tieto množstvá (ml) zásobných roztokov (I) a doplňte do 1 litra deionizovanej vody		Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Tieto látky sa líšia medzi médiami M4 a M7, ako je uvedené vyššie.
(2) Tieto roztoky sa pripravia jednotlivo, potom sa zlejú dokopy a okamžite sa autoklávujú.

Tabuľka 2

Makronutričné zásobné roztoky pre médiá M4 a M7

	Množstvo doplnené do 1 litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaných makronutričných zásobných roztokov pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

Tabuľka 3

Vitamínový zásobný roztok pre médiá M4 a M7

Všetky tri vitamínové roztoky sa skombinujú, aby sa vytvoril jeden vitamínový zásobný roztok.

	Množstvo doplnené do 1 litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaného vitamínového zásobného roztoku pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a M7 (mg/l)
Tiamín hydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamín (B12)	10	0,1	0,0010
Biotín	7,5	0,1	0,00075

LITERATÚRA

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke a H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25 – 33.

Elendt, B.P. a 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.

Dodatok 3

Príprava umelo pripraveného sedimentu

ZLOŽENIE SEDIMENTU

Zloženie umelo pripraveného sedimentu by malo byť takéto:

Zložka	Charakteristika	% suchej hmotnosti sedimentu
Rašelina	Rašelinníková rašelina, pH čo najbližšie k 5,5 – 6,0, bez viditeľných zvyškov rastlín, jemne rozomletá (veľkosť častíc ≤ 1 mm) a vysušená vzduchom	4 – 5
Kremenný piesok	Veľkosť zrniek: > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 µm	75 – 76
Kaolín	Obsah kaolinitu ≥ 30 %	20
Organický uhlík	Upravený pridaním rašeliny a piesku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, rozomletý na prach, chemicky čistý	0,05 – 0,1
Voda	Vodivosť ≤ 10 µS/cm	30 – 50

PRÍPRAVA

Rašelina sa usuší vzduchom a rozomelie na jemný prášok. V deionizovanej vode sa pomocou vysokovýkonného homogenizačného prístroja pripraví suspenzia požadovaného množstva rašelinového prášku. Hodnota pH tejto suspenzie sa upraví na 5,5 ± 0,5 pomocou $CaCO_3$. Suspenzia sa aspoň na dva dni uvedie do podmienok jemným premiešavaním pri teplote 20 ± 2 °C, aby sa stabilizovala hodnota pH a vytvorila stabilná mikrobiálna zložka. Opäť sa zmeria pH, ktoré by malo byť na úrovni 6,0 ± 0,5. Rašelinová suspenzia sa následne zmieša s ostatnými zložkami (pieskom a kaolínom) a s deionizovanou vodou, aby sa získal homogénny sediment s obsahom vody v rozsahu 30 – 50 % suchej hmotnosti sedimentu. Znova sa zmeria pH konečnej zmesi a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,5 – 7,5. Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa určila suchá hmotnosť a obsah organického uhlíka. Potom sa odporúča, aby sa pred použitím v teste toxicity pri pakomároch umelo pripravený sediment uviedol na sedem dní do rovnakých podmienok aké budú prevládať v nasledujúcom teste.

SKLADOVANIE

Suché zložky na prípravu umelého sedimentu sa môžu skladovať na suchom a chladnom mieste pri izbovej teplote. Umelo pripravený (mokrý) sediment by sa pred použitím v teste nemal skladovať. Mal by sa použiť ihneď po sedemdňovom období uvádzania do podmienok, ktorým sa končí jeho príprava.

LITERATÚRA

OECD (1984), Earthworm acute Toxicity Test, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paríž.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. a B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10 – 20.

Dodatok 4

Chemické charakteristiky prijateľnej riediacej vody

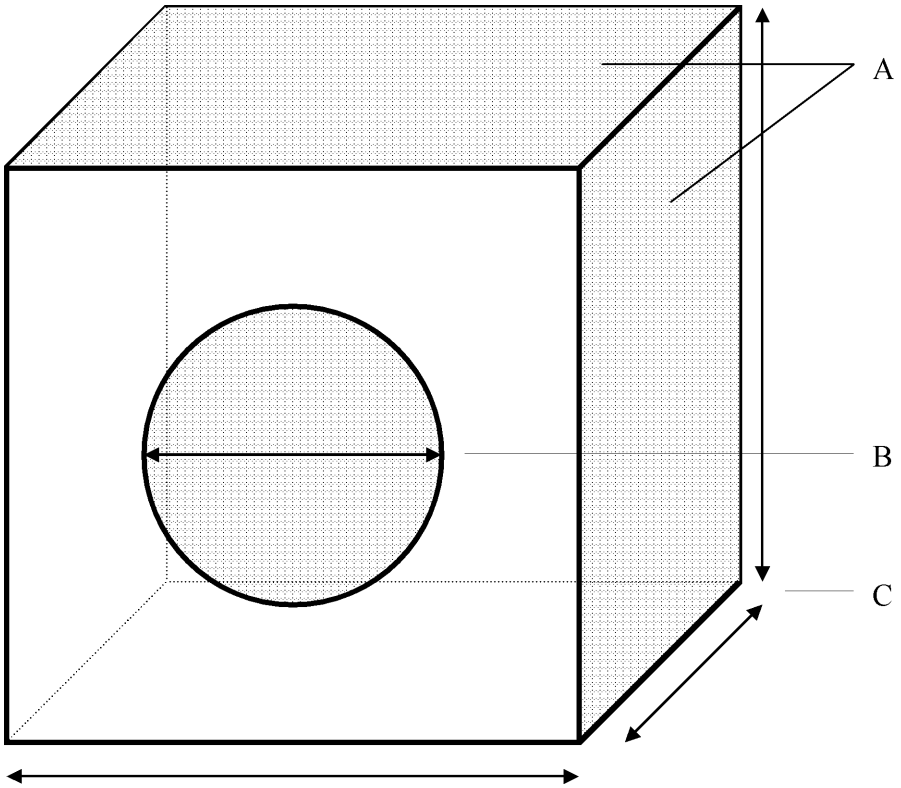
ZLOŽKA	KONCENTRÁCIE
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Tvrdosť ako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórové pesticídy a polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

(*) Treba však poznamenať, že ak existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou chemikáliou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nemá použiť Elendtovo médium M4).

Dodatok 5

Usmernenia na vykonanie testu

Príklad chovnej klietky:

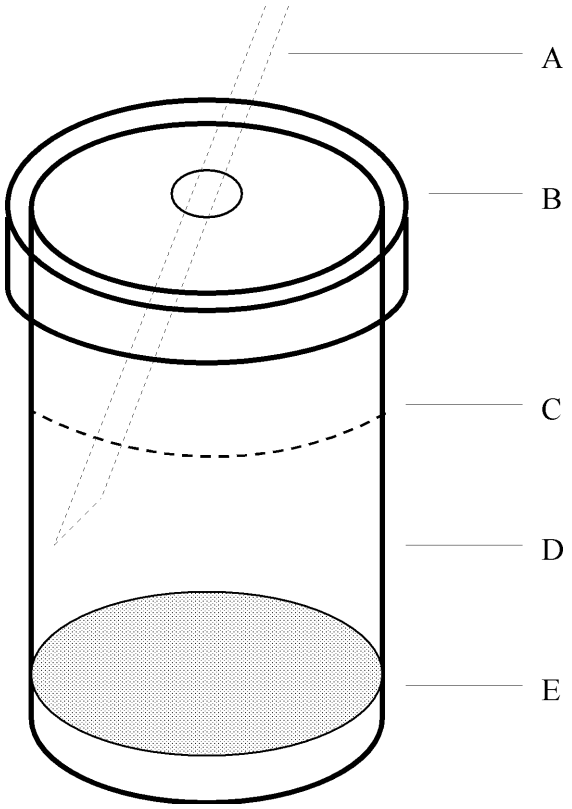


A: gáza na vrchu a aspoň na jednej strane klietky (veľkosť ôk približne 1 mm)

B: otvor na umiestnenie vykuklených dospelých jedincov do chovnej klietky a na odstránenie nakladených šnúr vajíčok z kryštalizačných misiek (nie sú zobrazené na tomto obrázku)

C: minimálna veľkosť chovnej klietky – dĺžka 30 cm, výška 30 cm, šírka 30 cm

Príklad testovacej nádoby:



A: Pasteurova pipeta na prívod vzduchu do nadložnej vody

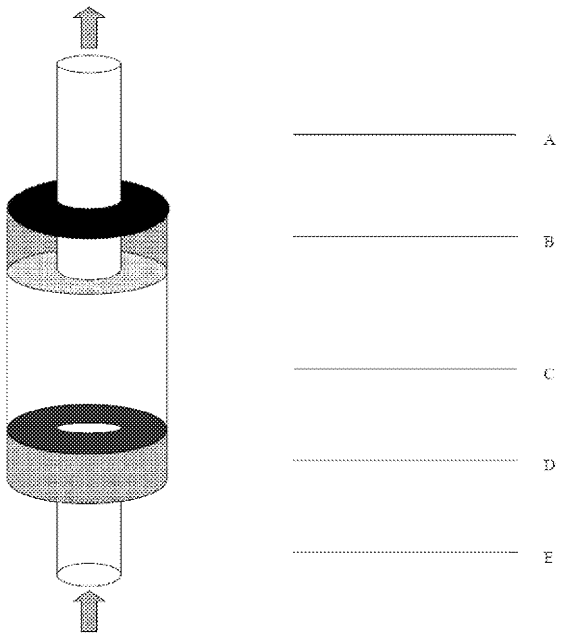
B: sklenené veko na zabránenie úniku vykuklených pakomárov

C: úroveň hladiny vody

D: testovacia nádoba (sklenená kadička s objemom minimálne 600 ml)

E: vrstva sedimentu

Príklad exhaustora na zachytenie dospelých pakomárov (šípky označujú smer prúdenia vzduchu):



A: sklenená trubička (vnútorný priemer približne 5 mm) pripojená k samonasávaciemu čerpadlu

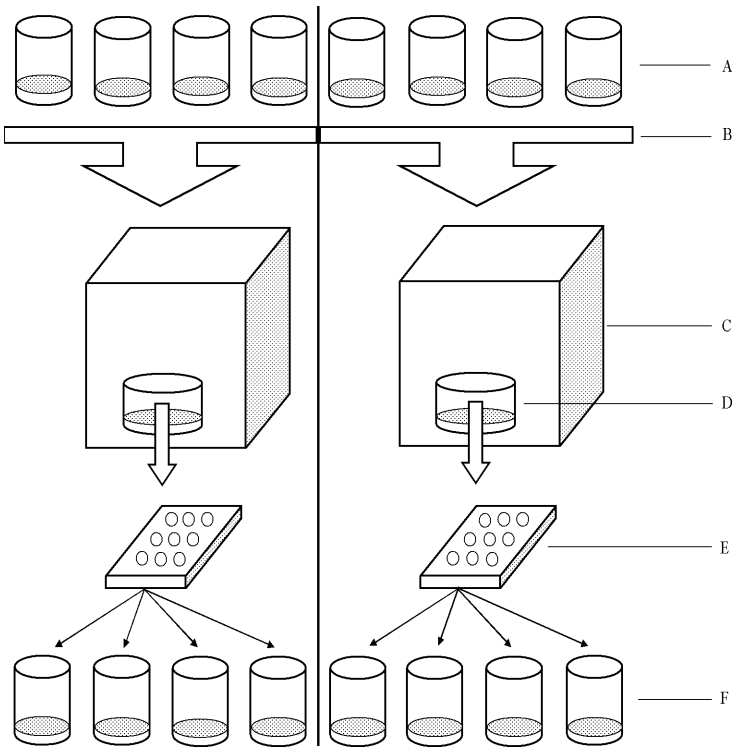
B: zátka z vulkanizovaného kaučuku perforovaná sklenenou trubičkou (A). Na vnútornej strane je otvor sklenenej trubičky (A) pokrytý bavlnou a gázou (veľkosť ôk približne 1 mm), aby sa pakomáre nasávané do exhaustora nepoškodili.

C: priehľadná nádoba (plastová alebo sklenená, dĺžka približne 15 cm) na chytené pakomáre

D: zátka z vulkanizovaného kaučuku perforovaná trubičkou (E). Na účely vypustenia pakomárov do chovnej klietky sa zátka D uvoľní z nádoby C.

E: trubička (plastová alebo sklenená, vnútorný priemer približne 8 mm) na zbieranie dospelých pakomárov z nádoby

Schematické zobrazenie testu životného cyklu:



A: 1. generácia – testovacie nádoby obsahujúce systém sediment – voda, osem replikátov, 20 lariev v prvom instare na nádobu

B: štyri testovacie nádoby na každú chovnú klietku a a B

C: chovné klietky (A a B) na rojenie, párenie a kladenie vajíčok

D: kryštalizačné misky na kladenie šnúr vajíčok

E: mikrotitračné platne, jedna jamka pre každú šnúru vajíčok

F: 2. generácia – testovacie nádoby obsahujúce systém sediment – voda, osem replikátov, 20 lariev v prvom instare na nádobu

C.41. TEST POHLAVNÉHO VÝVINU RÝB

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 234 (2011). Je založená na rozhodnutí z roku 1998 vypracovať nové alebo aktualizovať existujúce testovacie metódy na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov. Test pohlavného vývinu rýb (FSDT) bol identifikovaný ako sľubná testovacia metóda zahŕňajúca citlivé vývinové štádium rýb reagujúce na chemikálie podobné estrogénu a androgénu. Testovacia metóda prešla medzilaboratórnou validáciou od roku 2006 do roku 2010, v ktorej medaka japonská (*Oryzias latipes*), dánio pruhované (*Danio rerio*) a pichľavka sivá (*Gasterosteus aculeatus*) boli validované a čerebľa potočná (*Pimephales promelas*) bola validovaná čiastočne (41) (42) (43). Tento protokol zahŕňa medaku japonskú, pichľavku sivú a dánio pruhované. Protokol je v zásade rozšírením usmernenia OECD TG 210 na test toxicity v ranom štádiu života rýb (1), v ktorom expozícia pokračuje, kým ryby nedosiahnu pohlavnú diferenciáciu, t. j. približne 60 dní po vyliahnutí (dph) pre medaku japonskú, pichľavku sivú a dánio pruhované (v prípade iných druhov, ktoré budú validované v budúcnosti, sa obdobie expozície môže skrátiť alebo predĺžiť) a boli pridané sledované parametre endokrinnej citlivosti. Testom FSDT sa vyhodnocujú účinky a potenciálne nepriaznivé dôsledky údajných endokrinných disruptorov (napr. estrogénov androgénov a inhibítorov steroidogenézy) na pohlavný vývin v skorých štádiách života. Kombinácia dvoch hlavných endokrinných sledovaných parametrov, teda koncentrácie vitellogenínu (VTG) a fenotypového pomeru pohlaví, umožňuje na základe testu stanoviť spôsob pôsobenia testovanej chemikálie. Vzhľadom na zmenu fenotypového pomeru pohlaví významného pre celú populáciu možno test FSDT použiť na posúdenie nebezpečenstva a rizika. Ak sa však test použije na posúdenie nebezpečenstva alebo rizika, pichľavka sivá by sa nemala používať, lebo z doteraz získaných validačných údajov vyplýva, že pri tomto druhu nie sú zmeny fenotypového pomeru pohlaví v dôsledku testovanej chemikálie časté.

2. Protokol je založený na expozícii rýb chemikáliám vo vode počas obdobia citlivého na pohlavný vývin, v ktorom sa očakáva, že ryby budú najcitlivejšie na účinky endokrinných disruptorov, ktoré majú vplyv na pohlavný vývin. Ako ukazovatele vývinových odchýlok súvisiacich s endokrinnou činnosťou sa merajú dva hlavné sledované parametre: koncentrácie VTG a pomery pohlaví (podiely jednotlivých pohlaví), ktoré sa stanovujú histologickým vyšetrením gonád. Histopatologické vyšetrenie gonád (hodnotenie oocytov a spermatogénnych buniek a stanovenie ich štádia) je voliteľné. Ak to je možné, stanoví sa aj genetické pohlavie (napr. pri medake japonskej a pichľavke sivej). Prítomnosť genetického markera pohlavia je značnou výhodou, lebo zvyšuje spoľahlivosť štatistiky pomeru pohlaví a umožňuje zistiť jednotlivé prípady fenotypovej zmeny pohlavia. Medzi ďalšie vrcholové sledované parametre, ktoré by sa mali merať, patrí miera liahnutia, prežívanie, dĺžka a telesná hmotnosť. Testovaciu metódu možno prispôsobiť aj iným druhom ako tie, ktoré sú uvedené vyššie, za predpokladu, že tieto druhy prejdú validáciou rovnocennou validácii vykonanej pre medaku japonskú, pichľavku sivú a dánio pruhované, že kontrolné ryby sú na konci testu pohlavne diferencované, že hladiny VTG sú dostatočne vysoké na to, aby sa odhalili výrazné odchýlky súvisiace s chemikáliami a že citlivosť testovacieho systému sa stanoví pomocou referenčných chemikálií s endokrinným pôsobením [(anti)-estrogény, (anti)-androgény, inhibítory aromatázy atď.]. Všetky validačné správy obsahujúce údaje z testu FSDT s použitím iných druhov by navyše mala preskúmať organizácia OECD, pričom výsledok validácie by sa mal považovať za uspokojivý.

Úvodné úvahy a obmedzenia

3. VTG sa normálne tvorí v pečeni samičiek oviparných stavovcov v reakcii na endogénny estrogén v krvnom obehu (2). Je prekurzorom proteínov vajcového žĺtka a po vytvorení v pečeni sa krvným obehom dostane do vaječníka, kde ho prijmú a upravia vyvíjajúce sa vajíčka. Pri nedospelých rybách a dospelých samčekoch rýb je syntéza VTG veľmi obmedzená, ale zistiteľná, lebo nemajú dostatok estrogénu v krvnom obehu. Pečeň je však schopná syntetizovať a vylučovať VTG v reakcii na exogénnu estrogénovú stimuláciu (3) (4) (5).

4. Meranie VTG slúži na zistenie chemikálií s estrogénnym anti-estrogénnym a androgénnym spôsobom účinku a chemikálií, ktoré narúšajú steroidogenézu ako sú napríklad inhibítory aromatázy. Estrogénne chemikálie možno zistiť meraním indukcie tvorby VTG pri samčekoch rýb, čo je v partnersky preskúmanej vedeckej literatúre dostatočne zdokumentované. Indukcia tvorby VTG sa preukázala aj po expozícii aromatizovateľným androgénom (6) (7). Zníženie hladiny estrogénu v krvnom obehu pri samičkách, napríklad prostredníctvom inhibície aromatázy, ktorá konvertuje endogénny androgén na prirodzený estrogén 17β-estradiol, spôsobuje pokles koncentrácie VTG, čo sa používa na zisťovanie chemikálií s vlastnosťami inhibujúcimi aromatázu alebo

inhibítorov steroidogenézy vo všeobecnosti (33). Biologický význam reakcie VTG po estrogénnej inhibícii aromatázy je známy a dobre zdokumentovaný (8) (9). Je však možné, že tvorbu VTG pri samičkách môže ovplyvniť aj všeobecná toxicita a neendokrinné spôsoby toxického pôsobenia.

5. Viaceré metódy merania boli úspešne vyvinuté a štandardizované na bežné použitie na kvantifikáciu VTG vo vzorkách krvi, pečene, celého tela alebo homogenátu hlavy/chvosta odobratých z jednotlivých rýb. Týka sa to dánia pruhovaného, pichľavky sivej a medaky japonskej ako aj čiastočne validovaného druhu čerebľa potočná. Sú dostupné metódy enzýmového imunosorbentového stanovenia (ELISA) špecifické pre jednotlivé druhy využívajúce imunochémiu na kvantifikáciu VTG (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). V prípade medaky japonskej a dánia pruhovaného existuje dobrá korelácia medzi nameranou hodnotou VTG vo vzorkách krvnej plazmy, pečene a homogenátu, hoci homogenáty mávajú mierne nižšie hodnoty ako plazma (17) (18) (19). Dodatok 5 obsahuje odporúčané postupy na odber vzoriek na analýzu VTG.

6. Zmena vo fenotypovom pomere pohlaví (podiely pohlaví) je sledovaný parameter, ktorý odzrkadľuje zmenu pohlavia. Pomer pohlaví pri vyvíjajúcich sa rybách môžu v zásade ovplyvniť estrogény anti-estrogény androgény anti-androgény a chemikálie inhibujúce steroidogenézu (20). Preukázalo sa, že táto zmena pohlavia je čiastočne reverzibilné pri dániu pruhovanom (21) po expozícii chemikáliám podobným estrogénu, kým zmena pohlavia po expozícii chemikáliám podobným androgénu je trvalá (30). Pohlavie je definované ako samičie, samčie, intersexuálne (oocyty ako aj spermatogénne bunky v jednej gonáde) alebo nediferencované, pričom pri jednotlivých rybách sa stanovuje histologickým vyšetrením gonád. Usmernenie je uvedené v dodatku 7 a v usmerňovacom dokumente OECD na diagnózu endokrinnej histopatológie gonád rýb (22).

7. Genetické pohlavie sa skúma prostredníctvom genetických markerov ak v danom druhu rýb existujú. V prípade medaky japonskej možno samičie gény XX alebo samčie gény XY zistiť polymerázovou reťazovou reakciou (PCR), prípadne možno analyzovať gén domény DM spojený s chromozómom Y (DMY, negatívny alebo pozitívny) podľa opisu v odkazoch (23) (24). V prípade pichľavky sivej existuje rovnocenná metóda PCR na stanovenie genetického pohlavia, ktorá je opísaná v dodatku 10. Spoľahlivosť tohto testu sa zlepší ak genetické pohlavie možno individuálne spojiť s fenotypovým pohlavím, takže pri druhoch so zdokumentovanými genetickými pohlavnými markermi by sa malo určiť genetické pohlavie.

8. Dva hlavné endokrinné sledované parametre, teda VTG a pomer pohlaví, môžu v kombinácii preukázať endokrinný spôsob pôsobenia (MOA) chemikálie (tabuľka 1). Pomer pohlaví je biomarker významný pre celú populáciu (25) (26) a pri niektorých dobre vymedzených spôsoboch pôsobenia možno výsledky testu FSDT použiť na účely posúdenia nebezpečenstva a rizika ak to regulačná agentúra považuje za vhodné. Tieto spôsoby pôsobenia sú v súčasnosti estrogény androgény a inhibítory steroidogenézy.

Tabuľka 1

Reakcia endokrinných sledovaných parametrov na rôzne spôsoby pôsobenia chemikálií:

↑ = zvyšovanie, ↓ = znižovanie, — = neskúmalo sa

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Pomer pohlaví	ODKAZY
Slabý agonista estrogénu	↑	↑	↑♀ alebo ↑ nedif.	(27) (40)
Silný agonista estrogénu	↑	↑	↑♀ alebo ↑ nedif., žiadne ♂	(28) (40)
Antagonista estrogénu	—	—	↓♀, ↑ nedif.	(29)
Agonista androgénu	↓ alebo —	↓ alebo –	↑ ♂, žiadne ♀	(28) (30)
Antagonista androgénu	—	—	↑♀ ↑ intersex.	(31)
Inhibítor aromatázy	↓	↓	↓♀	(33)

9. Test FSDT sa nevzťahuje na reprodukčné štádium života rýb, takže chemikálie, ktoré môžu ovplyvniť rozmnožovanie pri nižšej koncentrácii ako pohlavný vývin, by sa mali preskúmať v teste, ktorý sa týka rozmnožovania.

10. Vymedzenie pojmov na účely tejto testovacej metódy je uvedené v dodatku 1.

11. Test FSDT *in vivo* je určený na zistenie chemikálií s androgénnymi a estrogénnymi vlastnosťami ako aj s anti-androgénnymi anti-estrogénnymi vlastnosťami a vlastnosťami inhibujúcimi steroidogenézu. Fázy validácie testu FSDT (1 a 2) zahŕňali estrogénne a androgénne chemikálie a chemikálie inhibujúce steroidogenézu. Účinky antagonistov estrogénu a androgénu v teste FSDT sú uvedené v tabuľke 1, ale tieto endokrinné spôsoby pôsobenia (MOA) sú v súčasnosti menej zdokumentované.

PRINCÍP TESTU

12. Pri teste sa štádiá rýb od čerstvo oplodnených vajíčok až po skončenie pohlavnej diferenciácie exponujú aspoň trom koncentráciám testovanej chemikálie rozpustenej vo vode. Podmienky testu by mali byť prietokové, pokiaľ to nie je nemožné vzhľadom na dostupnosť alebo povahu (napr. obmedzenú rozpustnosť) testovanej chemikálie. Test sa začína umiestnením čerstvo oplodnených vajíčok (pred ryhovaním blastodisku) do skúšobných komôr. Plnenie komôr je pre jednotlivé druhy opísané v bode 27. V prípade validovaných druhov rýb, teda medaky japonskej, pichľavky sivej a dánia pruhovaného, sa test ukončí pri 60 dph. Po ukončení testu sa všetky ryby humánnym spôsobom usmrtia. Z každej ryby sa odoberie biologická vzorka (krvná plazma, pečeň alebo homogenát hlavy/chvosta) na analýzu VTG a zvyšná časť sa zafixuje na účely histologického vyšetrenia gonád na určenie fenotypového pohlavia. Voliteľne možno vykonať histopatologické vyšetrenie (napr. stanovenie štádia gonád, závažnosti intersexuálnej formy). V prípade druhov s príslušnými markermi sa odoberie biologická vzorka (z análnej alebo chrbtovej plutvy) na stanovenie genetického pohlavia (dodatky 9 a 10).

13. Prehľad príslušných podmienok testu špecifických pre validované druhy medaka japonská, pichľavka sivá a dánio pruhované je uvedený v dodatku 2.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

14. Mali by byť k dispozícii výsledky testu akútnej toxicity alebo inej skúšky krátkodobej toxicity [napr. testovacej metódy C.14 (34) a OECD TG 210 (1)], vykonanej podľa možnosti s druhmi zvolenými na tento test. To znamená, že má byť známa rozpustnosť vo vode a tlak pary testovanej chemikálie a že je dostupná spoľahlivá analytická metóda na kvantifikáciu chemikálie v skúšobných komorách so známou a zdokumentovanou presnosťou a detekčným limitom.

15. Medzi ďalšie užitočné informácie patrí štruktúrny vzorec, čistota chemikálie, stabilita vo vode a na svetle, pKa, P_{ow} a výsledky testu na ľahkú biodegradovateľnosť (testovacia metóda C.4) (35).

Kritériá prijateľnosti testu

16. Na to, aby boli výsledky testu prijateľné, musia platiť tieto podmienky:

— koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť počas testu aspoň 60 % z rozpustnosti vzdušného kyslíka (ASV),

— teplota vody by sa v danom čase počas obdobia expozície nemala medzi skúšobnými komorami líšiť o viac ako ± 1,5 °C a musí sa udržiavať v teplotných rozsahoch vymedzených pre testovací druh (dodatok 2),

— mala by byť k dispozícii validovaná metóda na analýzu expozície chemikálii s detekčným limitom podstatne nižším ako najnižšia nominálna koncentrácia a mali by sa zhromaždiť dôkazy preukazujúce, že koncentrácie testovanej chemikálie v roztoku sa uspokojivo udržiavali v rozsahu ± 20 % priemerných nameraných hodnôt,

— počet všetkých oplodnených vajíčok, ktoré prežili v kontrolných skupinách, prípadne v kontrolných skupinách s rozpúšťadlom, musí byť väčší alebo rovnaký ako limity stanovené v dodatku 2,

— kritériá prijateľnosti týkajúce sa rastu a podielov pohlaví na konci testu sú založené na údajoch z kontrolných skupín (zo spojenej kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom a vodou, pokiaľ sa výrazne nelíšia, tak len zo skupiny s rozpúšťadlom):

		Medaka japonská	Dánio pruhované	Pichľavka sivá
Rast	Mokrá hmotnosť ryby vytretej do sucha	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Dĺžka (štandardná dĺžka)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Pomer pohlaví (% samčekov alebo samičiek)		30 – 70 %	30 – 70 %	30 – 70 %

— ak sa použije rozpúšťadlo, nemalo by mať žiadny štatisticky významný účinok na prežívanie a nemalo by mať žiadne účinky narušujúce endokrinný systém ani iné nepriaznivé účinky na skoré štádiá života zistené analýzou kontrolnej skupiny pre rozpúšťadlo.

Ak sa zistí odchýlka od kritérií prijateľnosti testu, dôsledky by sa mali posudzovať s ohľadom na spoľahlivosť testovacích údajov a tieto úvahy by mali byť zahrnuté do správy.

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Skúšobné komory

17. Možno použiť akékoľvek komory zo skla, nehrdzavejúcej ocele alebo iné chemicky inertné komory. Rozmery komôr by mali byť dostatočne veľké, aby zodpovedali kritériám pre stupeň zaťaženia uvedeným ďalej. Je potrebné umiestniť skúšobné komory náhodne na testovacej ploche. Náhodný blokový dizajn, v ktorom sa každá koncentrácia nachádza v každom bloku, sa uprednostňuje pred úplne náhodným dizajnom. Skúšobné komory by sa mali chrániť pred nežiaducimi narušeniami.

Výber druhov

18. Odporúčané druhy rýb sú uvedené v dodatku 2. Postupy na zahrnutie nových druhov sú uvedené v bode 2.

Chov rodičovských rýb

19. Podrobnosti o chove rodičovských rýb za uspokojujúcich podmienok nájdete v usmernení OECD TG 210 (1). Rodičovské ryby sa majú kŕmiť vhodnou potravou raz alebo dvakrát denne.

Manipulácia s embryami a larvami

20. Embryá a larvy sa môžu najskôr exponovať v hlavnej komore umiestnené v menších komorách zo skla alebo nehrdzavejúcej ocele so sieťovanými bočnými alebo čelnými stenami, ktoré umožňujú tok testovanej chemikálie cez komoru. Neturbulentný tok cez tieto malé komory možno zabezpečiť ich zavesením na ramene upravenom na pohyb komory nadol a nahor tak, aby organizmy zostali vždy ponorené.

21. Ak sa v hlavnej testovacej komore použili nádoby, mriežky alebo sieťky na zadržiavanie vajíčok, tieto obmedzenia by sa po vyliahnutí lariev mali odstrániť okrem sieťok, ktoré by sa mali zachovať, aby sa zabránilo úniku rýb. Ak je potrebné preniesť larvy, nemali by sa vystaviť vzduchu a nemali by sa používať siete na vylovenie rýb z nádob na vajíčka. Načasovanie tohto prenosu sa mení v závislosti od druhu, pričom prenos nemusí byť vždy potrebný.

Voda

22. Ako voda použitá na testovanie je vhodná každá voda, v ktorej testovacie druhy vykazujú kontrolné prežívanie aspoň také dobré ako vo vode opísanej v dodatku 3. Počas celého trvania testu má mať konštantnú kvalitu. V pravidelných intervaloch sa majú odoberať vzorky na analýzu, aby sa overilo, že riediaca voda neprimeraným spôsobom neovplyvňuje výsledky testu (napríklad reakciou s testovanou chemikáliou) alebo že nemá nepriaznivý vplyv na násadu rýb. Mal by sa merať celkový organický uhlík, vodivosť, pH a suspendované pevné látky, napríklad každé tri mesiace ak je známe, že riediaca voda má pomerne konštantnú kvalitu. Ak je kvalita vody pochybná, mal by sa merať obsah ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) a pesticídov. Údaje o chemickej analýze a odbere vody možno nájsť v bode 34.

Testovacie roztoky

23. Ak to je prakticky možné, mal by sa použiť prietokový systém. Na účely prietokových testov je potrebný systém, ktorý do skúšobných komôr nepretržite privádza a zrieďuje zásobný roztok testovanej chemikálie v sérii koncentrácií (napr. meracie čerpadlo, proporcionálny zmiešavač a saturačný systém). Prietoky zásobných roztokov a riediacej vody sa majú kontrolovať v určitých intervaloch počas testu, pričom sa v priebehu testu nesmú meniť o viac ako 10 %. Za vhodný sa považuje prietok zodpovedajúci aspoň piatim objemom skúšobnej komory za 24 hodín (1). Treba dbať na to, aby sa nepoužívali plastové trubice ani iné materiály, z ktorých niektoré môžu obsahovať biologicky aktívne chemikálie alebo môžu adsorbovať testovanú chemikáliu.

24. Zásobný roztok by sa podľa možnosti mal pripraviť bez použitia rozpúšťadiel jednoduchým premiešaním alebo pretrepaním testovanej chemikálie v riediacej vode s použitím mechanických prostriedkov (napr. miešaním alebo ultrazvukom). Ak sa testovaná chemikália ťažko rozpúšťa vo vode, mali by sa použiť postupy uvedené v usmerňovacom dokumente OECD o testovaní vodnej toxicity ťažkých látok a zmesí (36). Používaniu rozpúšťadiel sa treba vyhnúť, ale v niektorých prípadoch môže byť potrebné na vytvorenie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku. Príklady vhodných rozpúšťadiel sú uvedené v literatúre (36).

25. Treba sa vyhnúť semistatickým testovacím podmienkam, pokiaľ to nie je odôvodnené závažnými dôvodmi spojenými s testovanou chemikáliou (napr. stabilitou, obmedzenou dostupnosťou, vysokými nákladmi alebo rizikom). V prípade semistatickej metódy možno použiť dva rôzne postupy obnovy. Buď sa nové testovacie roztoky pripravia v čistých komorách a prežívajúce vajíčka a larvy sa opatrne prenesú do nových komôr alebo sa testovacie organizmy nechajú v skúšobných komorách a časť (aspoň dve tretiny) testovacej vody sa mení každý deň.

POSTUP

Podmienky expozície

Zber vajíčok a trvanie

26. S cieľom zabrániť genetickému skresleniu sa odoberú vajíčka od najmenej troch chovných párov alebo skupín, následne sa zmiešajú a náhodne vyberú na test. V prípade pichľavky sivej si pozrite opis umelého oplodnenia v dodatku 11. Test by sa mal začať čo najskôr po oplodnení vajíčok, pričom embryá by sa podľa možnosti mali ponoriť do testovacích roztokov pred začiatkom ryhovania blastodisku alebo čo najskôr po tejto fáze a nie neskôr ako 12 hodín po oplodnení. Test by mal trvať dovtedy, kým sa v kontrolnej skupine neukončí pohlavná diferenciácia (60 dph pre medaku japonskú, pichľavku sivú i dánio pruhované).

Násada

27. Počet oplodnených vajíčok na začiatku testu musí byť aspoň 120 na každú koncentráciu. Toto množstvo sa rozdelí medzi minimálne štyri replikáty (prijateľné rozdelenie do kontrolnej skupiny je na základe funkcie druhej odmocniny). Vajíčka by mali byť náhodne distribuované medzi jednotlivými skupinami s rôznymi koncentráciami chemikálie (s použitím štatistických tabuliek na randomizáciu). Stupeň zaťaženia (vymedzenie pojmu nájdete v dodatku 1) by mal byť dostatočne nízky na to, aby bolo možné udržať koncentráciu rozpustného kyslíka aspoň 60 % ASV bez priameho prevzdušňovania komôr. Pri prietokových testoch sa odporúča, aby stupeň zaťaženia neprekročil 0,5 g/l počas 24 hodín, pričom nikdy nesmie prekročiť množstvo 5 g/l roztoku. Najneskôr do 28 dní po oplodnení by sa mal prerozdeliť počet rýb v replikátoch tak, aby každý replikát obsahoval pokiaľ možno množstvo rýb. Ak dôjde k úmrtnosti súvisiacej s expozíciou, počet replikátov by sa mal primerane znížiť tak, aby bola hustota rýb medzi skupinami s jednotlivými koncentráciami pokiaľ možno rovnaká.

Svetlo a teplota

28. Fotoperióda a teplota vody by mali byť vhodné pre testovacie druhy (pokusné podmienky testu FSDT nájdete v dodatku 2).

Kŕmenie

29. Potrava a kŕmenie sú rozhodujúce a je nevyhnutné, aby sa v každom štádiu poskytovala správna potrava vo vhodných časových intervaloch a v dostatočnom množstve na podporu normálneho rastu. Kŕmiť by sa malo *ad libitum* a zároveň by sa mal minimalizovať prebytok. Na dosiahnutie dostatočnej rýchlosti rastu sa ryby majú kŕmiť aspoň dvakrát denne (cez víkendy je prijateľné raz denne), pričom medzi každým kŕmením by mali byť aspoň tri hodiny. Nadbytočná potrava a výkaly sa majú podľa potreby odstrániť, aby sa nehromadil odpad. Na základe získaných skúsenosti sa potrava a kŕmne režimy neprestajne upravujú s cieľom zlepšiť prežívanie a optimalizovať rast. Preto je potrebné vyvinúť ie na to, aby navrhovaný režim potvrdili uznávaní odborníci. Kŕmenie sa neposkytne 24 hodín pred koncom testu. Príklady vhodnej potravy sú uvedené v dodatku 2 [pozri tiež rámec OECD pre testovanie rýb (39)].

Testované koncentrácie

30. Odstup medzi testovanými chemikáliami by mal zodpovedať opisu v dodatku 4. Majú sa použiť minimálne tri testované koncentrácie v aspoň štyroch replikátoch. Pri výbere rozsahu testovaných koncentrácií je potrebné vziať do úvahy krivku vzťahujúcu hodnotu LC_{50} k obdobiu expozície z dostupných štúdií akútnej toxicity. Ak sa údaje majú použiť na posúdenie rizika, odporúča sa päť testovaných koncentrácií.

31. Koncentrácie chemikálie vyššie ako 10 % hodnoty LC_{50} pre akútnu toxicitu pri dospelých jedincoch alebo 10 mg/l, podľa toho, ktorá hodnota je nižšia, sa nemusia testovať. Maximálna testovaná koncentrácia by mala byť 10 % LC_{50} v štádiu života larvy/mladého jedinca.

Kontrolné skupiny

32. Okrem testovaných koncentrácií by sa mala analyzovať kontrolná skupina s riediacou vodou (≥ 4 replikáty) a podľa potreby aj kontrolná skupina s rozpúšťadlom (≥ 4 replikáty). V teste možno použiť iba rozpúšťadlá, o ktorých sa zistilo, že nemajú žiadny štatisticky významný vplyv na sledované parametre testu.

33. Ak sa použije rozpúšťadlo, jeho konečná koncentrácia nesmie byť vyššia ako 0,1 ml/l (36) a mala by byť rovnaká vo všetkých skúšobných komorách s výnimkou kontrolnej skupiny s riediacou vodou. Je však potrebné vynaložiť maximálne úsilie, aby sa predišlo použitiu rozpúšťadla alebo, aby sa jeho koncentrácia udržala na minime.

Frekvencia analytických stanovení a meraní

34. Pred začatím testu by sa mala vykonať chemická analýza koncentrácie testovanej chemikálie na kontrolu splnenia kritérií prijateľnosti. Všetky replikáty by sa mali analyzovať individuálne na začiatku a konci testu. Počas testu by sa aspoň raz za týždeň mal analyzovať jeden replikát na testovanú koncentráciu, pričom replikáty by sa mali systematicky obmieňať (1, 2, 3, 4, 1, 2…). Ak sa vzorky skladujú na neskoršiu analýzu, metódu skladovania vzoriek je potrebné vopred validovať. Vzorky sa majú filtrovať (napr. pomocou filtra s veľkosťou pórov 0,45 µm) alebo odstrediť, aby sa zabezpečilo, že stanovenia sa vykonajú na chemikálii v skutočnom roztoku.

35. Počas testu sa má vo všetkých skúšobných komorách merať rozpustený kyslík, pH, celková tvrdosť, vodivosť, slanosť (ak je relevantná) a teplota. Každý týždeň sa má merať aspoň rozpustený kyslík, slanosť (ak je relevantná) a teplota. Hodnota pH, vodivosť a tvrdosť sa majú merať na začiatku a konci testu. Teplota sa má podľa možnosti nepretržite monitorovať aspoň v jednej skúšobnej komore.

36. Výsledky by mali byť založené na nameraných koncentráciách. Ak sa však koncentrácia testovanej látky v roztoku počas celého testu uspokojivo udržiavala v rozmedzí ± 20 % nominálnej koncentrácie, potom výsledky môžu byť založené buď na nominálnych alebo na nameraných hodnotách.

Pozorovania a merania

Štádium embryonálneho vývinu

37. Expozícia by sa mala začať čo najskôr po oplodnení a pred začiatkom ryhovania blastodisku a nie neskôr ako 12 hodín po oplodnení, aby sa zabezpečila expozícia počas skorého embryonálneho vývinu.

Liahnutie a prežívanie

38. Pozorovania liahnutia a prežívania by sa mali vykonávať aspoň raz za deň a mali by sa zaznamenať príslušné počty. Mŕtve embryá, larvy a mladé ryby je potrebné odstrániť ihneď ako sa spozorujú, lebo sa môžu rýchlo rozkladať a môže ich narušiť činnosť iných rýb. Mimoriadnu pozornosť treba venovať tomu, aby sa pri odstraňovaní mŕtvych jedincov neudreli alebo fyzicky nepoškodili susedné vajíčka/larvy, ktoré sú mimoriadne krehké a citlivé. Kritériá úhynu sa menia podľa štádia života:

— vajíčka: najmä v skorých štádiách výrazná strata priesvitnosti a zmena sfarbenia spôsobená koaguláciou a/alebo zrážaním proteínov vedúca k bielemu nepriehľadnému vzhľadu,

— larvy a mladé ryby: nepohyblivosť a/alebo neprítomnosť respiračných pohybov a/alebo neprítomnosť tepu srdca a/alebo biele nepriehľadné sfarbenie centrálneho nervového systému a/alebo nereagovanie na mechanické podnety.

Abnormálny vzhľad

39. Je potrebné zaznamenať počet lariev alebo rýb s abnormálnym tvarom tela a opísať vzhľad a charakter abnormality. Treba poznamenať, že abnormálne embryá a larvy sa vyskytujú prirodzene a pri niektorých druhoch môžu byť rádovo v rozmedzí niekoľkých percent v kontrolných skupinách. Abnormálne živočíchy sa majú zo skúšobnej komory odstrániť len v prípade úhynu. V súlade so smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely však v prípade, že abnormality spôsobujú bolesť, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie a možno spoľahlivo predvídať smrť, je potrebné živočíchy umŕtviť a usmrtiť podľa opisu v bode 44 a na účely analýzy údajov považovať za uhynuté.

Abnormálne správanie

40. Ak sa vyskytnú abnormality, napr. hyperventilácia, nekoordinované plávanie, netypická nehybnosť a netypické správanie pri kŕmení, je potrebné ich výskyt zaznamenať.

Hmotnosť

41. Na konci testu sa všetky prežívajúce ryby musia usmrtiť (umŕtviť ak sa majú odobrať krvné vzorky) a odmeria sa individuálna mokrá hmotnosť (ryby vytreté do sucha).

Dĺžka

42. Na konci testu sa odmeria dĺžka jednotlivých rýb (štandardná dĺžka).

43. Na základe týchto pozorovaní sa získajú niektoré alebo všetky z nasledujúcich údajov, ktoré možno uviesť v správe:

— kumulovaná mortalita,

— počet zdravých rýb na konci testu,

— čas do začiatku liahnutia a konca liahnutia,

— dĺžka a hmotnosť prežívajúcich živočíchov,

— počet deformovaných lariev,

— počet rýb s abnormálnym správaním.

Odber vzoriek rýb

44. Odber vzoriek rýb sa vykonáva na konci testu. Odobraté ryby sa majú usmrtiť napr. pomocou látky MS-222 (100 – 500 mg/l tlmenej 200 mg $NaHCO_3$/l) alebo FA-100 (4-alyl-2-metoxyfenol: eugenol) a individuálne odmerať a odvážiť (mokrá hmotnosť, ryby vytreté do sucha) alebo umŕtviť ak sa majú odobrať krvné vzorky (pozri bod 49).

Odber vzoriek na analýzu VTG a určenie pohlavia prostredníctvom histologického hodnotenia

45. Všetky ryby sa majú odobrať a pripraviť na analýzu pohlavia a VTG. Všetky ryby sa majú histologicky analyzovať na účely určenia pohlavia. Na účely merania VTG je prijateľné odobrať podvzorku aspoň 16 rýb z každého replikátu. Ak sú výsledky analýzy VTG podvzoriek nejasné, je potrebné analyzovať viac rýb.

46. Postup odberu vzoriek na analýzu VTG a určenie pohlavia závisí od metódy analýzy VTG:

Metóda homogenátu hlavy/chvosta na účely analýzy VTG

47. Ryby sa usmrtia. Hlava a chvost z každej ryby sa skalpelom oddelia od tela ryby rezmi bezprostredne za prsnými plutvami a hneď za chrbtovou plutvou (pozri obrázok 1). Hlavová a chvostová časť každej ryby sa na účely analýzy VTG spoja, odvážia a jednotlivo očíslujú, zmrazia v tekutom dusíku a skladujú pri teplote – 70 C alebo nižšej. Telová časť ryby sa očísluje a zafixuje vo vhodnom fixačnom prostriedku na účely histologického hodnotenia (22). Pomocou tejto metódy sa vyhodnotí VTG a histopatológia na každom jedincovi, takže prípadná zmena v hladine VTG sa môže dať do súvislosti s fenotypovým pohlavím ryby alebo genetickým pohlavím (medaka japonská a pichľavka sivá) ryby. Ďalšie informácie nájdete v usmernení pre homogenizáciu (dodatok 5) a usmernení pre kvantifikáciu VTG (dodatok 6).

Metóda homogenátu pečene na účely analýzy VTG

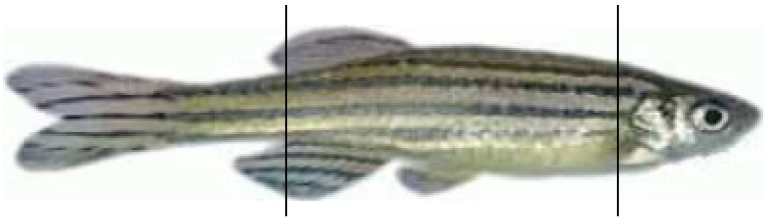
48. Ryby sa usmrtia. Pečeň sa oddelí rezom a skladuje pri teplote – 70 C alebo nižšej. Odporúčané postupy na vyrezanie pečene a predbežné spracovanie nájdete v usmernení OECD TG 229 (37) alebo v kapitole C.37 tejto prílohy (38). Pečene sa potom individuálne homogenizujú podľa opisu v usmernení OECD TG 229 alebo v kapitole C.37 tejto prílohy. Odobratý supernatant sa použije na odmeranie VTG pomocou homologickej metódy ELISA [príklad kvantifikácie nájdete v dodatku 6 pre dánio pruhované alebo v usmernení OECD TG 229 (37) pre medaku japonskú]. S použitím tohto prístupu je tiež možné získať údaje o VTG a histológii gonád jednotlivých rýb.

Metóda krvnej plazmy na účely analýzy VTG

49. Krv sa odoberie z umŕtvených rýb vpichom do srdca, rezom chvostovej žily alebo chvosta a odstredí sa pri teplote 4 °C na účely odberu plazmy. Plazma sa až do použitia skladuje pri teplote – 70 °C alebo nižšej. Celá ryba sa usmrtí a zafixuje na účely histologického vyšetrenia. Vzorky plazmy i samotné ryby sa individuálne očíslujú, aby bolo možné stanoviť súvislosť hladiny VTG s pohlavím ryby.

Obrázok 1

Ako rezať rybu na účely merania VTG pomocou homogenátu hlavy/chvosta a histologického hodnotenia strednej časti



Rez za chrbtovou plutvou Rez za hrudnou plutvou

Určenie genetického pohlavia

50. V prípade druhov s vhodnými markermi sa na určenie genetického pohlavia odoberú biologické vzorky jednotlivých rýb. V prípade medaky japonskej sa odoberie análna alebo chrbtová plutva. Podrobný opis je uvedený v dodatku 9 vrátane odberu tkaniva a určenia pohlavia metódou PCR. Opis odberu tkaniva a určenia pohlavia metódou PCR pre pichľavku sivú je uvedený v dodatku 10.

Meranie VTG

51. Meranie VTG by malo byť založené na kvantitatívnej a analyticky validovanej metóde. Mali by byť k dispozícii informácie o variabilite metódy, ktorá sa použila v danom laboratóriu, v rámci skúšky a medzi skúškami. Zdroj variability v rámci laboratória a medzi laboratóriami je (najpravdepodobnejšie) založený na rôznych vývinových štádiách populácie rýb. Vzhľadom na variabilitu merania VTG by sa k hodnotám NOEC založeným len na tomto sledovanom parametri malo pristupovať veľmi opatrne. Sú k dispozícii rôzne metódy na posúdenie tvorby VTG pri druhoch rýb použitých v tejto skúške. Pomerne citlivou a zároveň špecifickou meracou metódou je stanovenie koncentrácie bielkovín pomocou enzýmového imunosorbentového stanovenia (ELISA). Mali by sa použiť homologické protilátky (vytvorené proti VTG rovnakého druhu) a najdôležitejšie homologické štandardy.

Určenie pohlavia

52. V závislosti od postupu odberu vzoriek na analýzu VTG sa celá ryba alebo zvyšná stredná časť každej ryby umiestni do označenej spracovacej kazety a zafixuje vo vhodnom fixačnom prostriedku na účely histologického určenia pohlavia (voliteľne aj na vyhodnotenie štádia gonád). Usmernenia na fixáciu a zaliatie sú uvedené v dodatku 7 ako aj v usmerňovacom dokumente OECD o diagnóze endokrinnej histopatológie gonád rýb (22). Po spracovaní sa ryby zalejú do parafínových blokov. Ryby sa do parafínového bloku umiestňujú pozdĺžne. Z každého jedinca sa odoberie aspoň šesť pozdĺžnych rezov (s hrúbkou 3 – 5 µm) v čelnej rovine, ktoré obsahujú tkanivo z obidvoch gonád. Rozstup medzi týmito rezmi by mal byť približne 50 µm pri samčekoch a 250 µm pri samičkách. Keďže však každý blok bude často obsahovať samčekov i samičky (ak je v každom bloku zaliatych viac jedincov), rozstup medzi rezmi z týchto blokov by mal byť približne 50 µm, kým sa nezíska aspoň šesť rezov gonád z každého samčeka. Potom možno rozstup medzi rezmi zvýšiť na približne 250 µm pre samičky. Rezy sa zafarbia hematoxylínom a eozínom a vyhodnotia pomocou svetelnej mikroskopie s dôrazom na pohlavie (samčie, samičie, intersexuálne alebo nediferencované). Intersexuál je vymedzený ako prítomnosť viac, ako jedného oocytu v semenníkoch na šesť analyzovaných rezov alebo prítomnosť spermatogénnych buniek (áno/nie) vo vaječníkoch. Histopatologické vyšetrenie a stanovenie štádia vaječníkov a semenníkov je voliteľné, ale ak sa vykonáva, výsledky sa majú štatisticky analyzovať a uviesť do správy. Treba poznamenať, že niektoré druhy rýb prirodzene nemajú plne vyvinutý pár gonád a môže byť prítomná len jedna gonáda (napr. medaka japonská a príležitostne dánio pruhované). Všetky tieto pozorovania sa musia zaznamenať.

53. Určenie genetického pohlavia pri jednotlivých medakách japonských je založené na prítomnosti alebo neprítomnosti génu určujúceho samčie pohlavie pri medakáchch DMY, ktorý sa nachádza na chromozóme Y. Genotypové pohlavie medaky možno identifikovať sekvenovaním génu DMY z DNA vyextrahovanej napríklad z kúska análnej alebo chrbtovej plutvy. Prítomnosť génu DMY znamená samčieho jedinca (XY) bez ohľadu na fenotyp, zatiaľ čo chýbajúci gén DMY znamená samičieho jedinca (XX) bez ohľadu na fenotyp (23). Usmernenie na prípravu tkaniva a použitie metódy PCR sú uvedené v dodatku 9. Genetické pohlavie jednotlivých pichľaviek sivých sa takisto určuje metódou PCR, ktorá je opísaná v dodatku 10.

54. Výskyt intersexuálov (vymedzenie pojmu je uvedené v dodatku 1) je potrebné uviesť do správy.

Sekundárne pohlavné znaky

55. Pri druhoch ako medaka japonská sekundárne pohlavné znaky reguluje endokrinný systém. Pozorovania fyzického vzhľadu rýb by sa preto mali podľa možnosti uskutočniť na konci expozície. V prípade medaky japonskej je bradavkový útvar v zadnej časti análnej plutvy samičiek citlivý na androgén. Kapitola C.37 tejto prílohy (38) obsahuje príslušné fotografie samčích sekundárnych pohlavných znakov a androgenizovaných samičiek.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

56. Je dôležité, aby sa sledovaný parameter vyhodnocoval pomocou najsilnejšieho platného štatistického testu. Pokusnou jednotkou je replikát, ale do štatistického testovania je potrebné zahrnúť aj variabilitu v rámci replikátu. V dodatku 8 je uvedená schéma rozhodovania ako pomôcka pri výbere najvhodnejšieho štatistického testu na základe povahy údajov získaných z testu. Hladina štatistickej významnosti pre všetky zahrnuté sledované parametre je 0,05.

Podiel pohlaví a genetických pohlaví

57. Podiely pohlaví sa majú analyzovať z hľadiska významného účinku (prístup NOEC/LOEC) expozície pomocou Jonckheereho-Terpstrovho (trendového) testu ak existuje monotónny priebeh krivky závislosti dávka-odpoveď. Ak sa zistí nemonotónnosť, je potrebné použiť párový test. V prípade normality a homogénneho rozptylu použite Dunnettov test. V prípade heterogénneho rozptylu použite Tamhaneho-Dunnettov test. V ostatných prípadoch použite presný Mann-Whitneyho test s Bonferroniho-Holmovou úpravou. Dodatok 8 obsahuje schému opisujúcu štatistiku pre podiely pohlaví. Podiely pohlaví sa musia uvádzať v tabuľkách ako podiely koncentrácií ± SD pre samčekov, samičky, intersexuálov a nediferencované jedince. Je potrebné uviesť štatistickú významnosť. Príklady sú uvedené vo validačnej správe o teste FSDT, fáza 2 (42). Genetické pohlavie sa uvádza ako percento zmeny fenotypového pohlavia pre samčekov, samičky, intersexuálov a nediferencované jedince.

Koncentrácie VTG

58. Koncentrácie VTG sa majú analyzovať z hľadiska významného účinku (prístup NOEC/LOEC) expozície. Uprednostňuje sa Dunnettov test pred t-testom s Bonferroniho korekciou. Ak sa použije Bonferroniho korekcia, uprednostňuje sa Bonferroniho-Holmova korekcia. Je možné urobiť logaritmickú transformáciu hodnôt VTG, aby sa dosiahla normalita a homogenita rozptylu. Ďalej ak je závislosť veličiny od koncentrácie v súlade s monotónnosťou, namiesto všetkých uvedených testov sa uprednostňuje Jonckheereho-Terpstrov test. Ak sa použijú t-testy alebo Dunnettov test, nie je potrebné dosiahnuť významnosť v F-teste analýzy ANOVA na to, aby bolo možné pokračovať. Podrobnosti nájdete v schéme v dodatku 8. Výsledky sa majú uvádzať v tabuľkách ako priemery koncentrácií ± SD samostatne pre samčekov, samičky, intersexuálov a nediferencované jedince. Je potrebné uviesť štatistickú významnosť pre fenotypové samičky a fenotypových samčekov. Príklady sú uvedené vo validačnej správe o teste FSDT, fáza 2 (42).

Skutočné koncentrácie testovanej chemikálie

59. Skutočné koncentrácie testovanej chemikálie v komorách sa majú analyzovať vo frekvenciách uvedených v bode 34. Výsledky sa majú uvádzať v tabuľkách ako priemerná koncentrácia ± SD pre replikáty a pre jednotlivé koncentrácie, pričom treba uviesť informácie o počte vzoriek a extrémnych hodnotách odchyľujúcich sa od priemernej koncentrácie v jednotlivých skupinách o ± 20 %. Príklady sú uvedené vo validačnej správe o teste FSDT, fáza 2 (42).

Interpretácia výsledkov

60. Výsledky by sa mali interpretovať s opatrnosťou ak namerané koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích roztokoch dosahujú úrovne blízke detekčnému limitu analytickej metódy.

Protokol o skúške

61. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálno-chemické vlastnosti, chemické identifikačné údaje vrátane čistoty a analytickej metódy kvantifikácie testovanej chemikálie.

Podmienky testu

— použitý postup testu (napr. prietokový, semistatický/obnovovací), koncepcia testu vrátane testovaných koncentrácií, metódy prípravy zásobných roztokov (v prílohe), frekvencie obnovovania (ak sa použije solubilizačný prostriedok, musí sa uviesť jeho názov a koncentrácia),

— nominálne testované koncentrácie, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v skúšobných komorách a metóda akou sa vypočítali (použitá analytická metóda by mala byť uvedená v prílohe), dôkaz o tom, že merania odkazujú na koncentrácie testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,

— kvalita vody v skúšobných komorách: pH, tvrdosť, teplota a koncentrácia rozpustného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy, zdroj, podávané množstvo a frekvencia a analýzy kontaminujúcich látok (napr. PCB, PAH a organochlórové pesticídy) ak to je relevantné.

Výsledky

— dôkaz, že kontrolné skupiny splnili kritériá validity: údaje o miere liahnutia by sa mali uviesť v tabuľkách ako percento na replikát a na koncentráciu. Je potrebné zdôrazniť odchýlky od kritérií prijateľnosti (v kontrolných skupinách). Údaje o prežití by sa mali uviesť ako percento na replikát a na koncentráciu. Je potrebné zdôrazniť odchýlky od kritérií validity (v kontrolných skupinách),

— jasné uvedenie výsledkov získaných pre rôzne sledované parametre: prežívanie embryí a úspech liahnutia, externé abnormality, dĺžka a hmotnosť, merania VTG (ng/g homogenátu, ng/ml plazmy alebo ng/mg pečene), histológia gonád, výskyt akýchkoľvek nezvyčajných reakcií rýb a akékoľvek viditeľné účinky testovanej chemikálie.

62. Výsledky sa majú uviesť ako priemerné hodnoty ± štandardná odchýlka (SD) alebo štandardná chyba (SE). Štatistické údaje sa majú uvádzať minimálne ako hodnoty NOEC a LOEC a intervaly spoľahlivosti. Je potrebné dodržiavať štatistickú schému (dodatok 8).

LITERATÚRA

1. OECD (1992), Fish, Early Life Stage Toxicity Test, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paríž.

2. Jobling, S., D. Sheahan, J.A. 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. a 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 a 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 a 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 a 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 a 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. Sumpter, M. Zerulla a 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 a 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 a 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 a 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. 1699 – 1708.

12. Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara a 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 a 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 a 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 a 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. a 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. a 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 a 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 a 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. a 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 a 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. 1088 – 1098.

22. OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paríž.

23. Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi a. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata a 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 a 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 a 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 a K.A. Kidd (2009) ‚Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake', Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, s. 1920 – 1935.

27. Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno a 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 a P. Bjerregaard (2006), ‚Detection of endocrine disrupters: 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 a P. Bjerregaard (2004), ‚Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)', Fish Physiology and Biochemistry 30, s. 257 – 266.

30. Morthorst, J.E., H. Holbech a 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 a 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 a 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 a 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. Kapitola C.14 tejto prílohy, rastová skúška na mladých jedincoch.

35. Kapitola C.4 tejto prílohy, ľahká biodegradovateľnosť.

36. OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paríž.

37. OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paríž.

38. Kapitola C.37 tejto prílohy, 21-Day Fish Assay: A Short Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition.

39. OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paríž

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*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paríž.

42. OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paríž.

43. OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paríž.

44. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely. Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33.

Dodatok 1

Skratky a vymedzenie pojmov

Vrcholový sledovaný parameter: účinok pôsobiaci na úrovni populácie.

ASV: rozpustnosť vzdušného kyslíka.

Biomarker: účinok pôsobiaci na úrovni jedinca.

Chemikália: látka alebo zmes.

Dph: dni po vyliahnutí.

DMY: gén domény DM špecifický pre chromozómom Y potrebný na vývin samčekov rýb rodu medaka.

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie

Hmotnosť ryby: mokrá hmotnosť ryby (vytretej do sucha).

FSDT: test pohlavného vývinu rýb.

Os HPG: os hypotalamus – hypofýza – gonády.

Intersexuálna ryba: ryba s viac ako jedným oocytom v semenníkoch na 6 analyzovaných rezov alebo so spermatogénnymi bunkami (áno/nie) vo vaječníkoch.

Stupeň zaťaženia: mokrá hmotnosť rýb na objem vody.

MOA: spôsob pôsobenia.

RT-PCR: polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkriptázou.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Nediferencovaná ryba: ryba s gonádami bez rozoznateľných zárodočných buniek.

VTG: vitellogenín.

Dodatok 2

Experimentálne podmienky testu FSDT (sladkovodné druhy)

1. Odporúčané druhy	Medaka japonská (*Oryzias latipes*)	Dánio pruhované (*Danio rerio*)	Pichľavka sivá (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Druh testu	Prietokový alebo semistatický	Prietokový alebo semistatický	Prietokový alebo semistatický
3. Teplota vody	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Kvalita osvetlenia	Žiarivky (široké spektrum)	Žiarivky (široké spektrum)	Žiarivky (široké spektrum)
5. Intenzita svetla:	10 – 20 µE/m²/s, 540 – 1 080 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)	10 – 20 µE/m²/s, 540 – 1 080 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)	10 – 20 µE/m²/s, 540 – 1 080 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)
6. Fotoperióda	12 – 16 hod. svetlo, 8 – 12 hod. tma	12 – 16 hod. svetlo, 8 – 12 hod. tma	16 hod. svetlo, 8 hod. tma
7. Minimálna veľkosť komory	Jednotlivé komory by mali obsahovať minimálne 7 l vody	Jednotlivé komory by mali obsahovať minimálne 7 l vody	Jednotlivé komory by mali obsahovať minimálne 7 l vody
8. Výmena objemu testovacích roztokov	Minimálne päťkrát denne	Minimálne päťkrát denne	Minimálne päťkrát denne
9. Vek testovacích organizmov na začiatku expozície	Čerstvo oplodnené vajíčka (skoré štádium blastuly)	Čerstvo oplodnené vajíčka (skoré štádium blastuly)	Čerstvo oplodnené vajíčka
10. Počet vajíčok na testovanú koncentráciu	Minimálne 120	Minimálne 120	Minimálne 120
11. Počet testovaných koncentrácií	Minimálne tri (plus primerané kontrolné skupiny)	Minimálne tri (plus primerané kontrolné skupiny)	Minimálne tri (plus primerané kontrolné skupiny)
12. Počet replikátov na testovanú koncentráciu	Minimálne štyri (okrem kontrolných skupín, kde sa počet určí podľa funkcie druhej odmocniny)	Minimálne štyri (okrem kontrolných skupín, kde sa počet určí podľa funkcie druhej odmocniny)	Minimálne štyri (okrem kontrolných skupín, kde sa počet určí podľa funkcie druhej odmocniny)
13. Kŕmny režim	Živé žiabronôžky rodu *Artemia*, dospelé zmrazené žiabronôžky soľné, vločkové krmivo atď. Odporúča sa kŕmiť dvakrát denne.	Špeciálna potrava pre mladé ryby, živé žiabronôžky rodu *Artemia*, dospelé zmrazené žiabronôžky soľné, vločkové krmivo atď. Odporúča sa kŕmiť dvakrát denne.	Živé žiabronôžky rodu *Artemia*, dospelé zmrazené žiabronôžky soľné, vločkové krmivo atď. Odporúča sa kŕmiť dvakrát denne.

14. Vetranie	Žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % saturáciu	Žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % saturáciu	Žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 70 % saturáciu
15. Riediaca voda	Čistá povrchová, studňová alebo rekonštituovaná voda	Čistá povrchová, studňová alebo rekonštituovaná voda	Čistá povrchová, studňová alebo rekonštituovaná voda
16. Trvanie expozície testovanej chemikálii	60 dph	60 dph	60 dph
17. Biologické sledované parametre	Úspešné vyliahnutie, prežitie, výrazná morfológia, VTG, histológia gonád, genetické pohlavie, pomer pohlaví	Úspešné vyliahnutie, prežitie, výrazná morfológia, VTG, histológia gonád, pomer pohlaví	Úspešné vyliahnutie, prežitie, výrazná morfológia, VTG, histológia gonád, pomer pohlaví
18. Kritériá prijateľnosti testu pre spojené replikáty kontrolných skupín	Úspešné vyliahnutie > 80 %	Úspešné vyliahnutie > 80 %	Úspešné vyliahnutie > 80 %
	Prežitie po vyliahnutí ≥ 70 %	Prežitie po vyliahnutí ≥ 70 %	Prežitie po vyliahnutí ≥ 70 %
	Rast (mokrá hmotnosť ryby vytretej do sucha) > 150 mg	Rast (mokrá hmotnosť ryby vytretej do sucha) > 75 mg	Rast (mokrá hmotnosť ryby vytretej do sucha) > 120 mg
	Dĺžka (štandardná dĺžka) > 20 mm	Dĺžka (štandardná dĺžka) > 14 mm	Dĺžka (štandardná dĺžka) > 20 mm
	Pomer pohlaví (% samčekov alebo samičiek) 30 – 70 %	Pomer pohlaví (% samčekov alebo samičiek) 30 – 70 %	Pomer pohlaví (% samčekov alebo samičiek) 30 – 70 %

Dodatok 3

Chemické charakteristiky prijateľnej riediacej vody

ZLOŽKA	KONCENTRÁCIA
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórové pesticídy a polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

Dodatok 4

Podľa testovacej metódy C.14/Usmernenie o testovaných koncentráciách

Stĺpec (počet koncentrácií medzi 100 a 10 alebo medzi 10 a 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

(*) Zo stĺpca možno vybrať sériu troch (alebo viacerých) za sebou idúcich koncentrácií. Stredné body medzi koncentráciami v stĺpci (x) sa nachádzajú v stĺpci (2x + 1). Uvedené hodnoty môžu predstavovať koncentrácie vyjadrené ako percento na objem alebo hmotnosť (mg/l alebo µg/l). Hodnoty je podľa potreby možné násobiť alebo deliť akoukoľvek mocninou 10. Hodnoty v stĺpci 1 sa môžu použiť v prípade značnej neistoty v súvislosti s úrovňou toxicity.

Dodatok 5

Usmernenie na homogenizáciu hlavy a chvosta z mladých jedincov dánia pruhovaného, čereble potočnej, pichľavky sivej a medaky japonskej

Účelom tohto oddielu je opísať postupy, ktoré sa vykonávajú pred kvantifikáciou koncentrácie VTG. Možno použiť aj iné postupy, ktoré vedú k porovnateľnej kvantifikácii VTG. Namiesto homogenátu hlavy/chvosta je možné určiť koncentráciu VTG aj v krvnej plazme alebo pečeni.

Postup

1. Ryby sa umŕtvia a usmrtia v súlade s opisom testu.

2. Oddelí sa hlava a chvost ryby v súlade s opisom testu. **Dôležité**: Všetky nástroje a doska na rezanie sa musia medzi manipuláciami s jednotlivými rybami riadne vyčistiť a opláchnuť (napr. 96 % etanolom), aby sa zabránilo ‚znečisteniu VTG' zo samičiek alebo indukovaných samčekov na neindukovaných samčekov.

3. Hmotnosť hlavy a chvosta spolu z každej ryby sa odmeria s presnosťou na mg.

4. Po odvážení sa časti tela umiestnia do vhodných skúmaviek (napr. do 1,5 ml Eppendorfovej skúmavky) a zmrazia pri teplote – 80 °C až do homogenizácie alebo sa priamo homogenizujú na ľade pomocou dvoch plastových piestikov. (Môžu sa použiť aj iné metódy, ak sa vykonávajú na ľade a výsledkom je homogénna hmota). **Dôležité**: *Skúmavky musia byť náležite očíslované tak, aby bolo možné hlavu a chvost z ryby priradiť k príslušnému rezu tela použitému na histologické vyšetrenie gonád.*

5. Po vytvorení homogénnej hmoty sa pridá množstvo ľadovo studeného **homogenizačného tlmivého roztoku** (*) zodpovedajúce štvor- až desaťnásobku hmotnosti tkaniva (poznamenajte si riedenie). Pokračujte v práci s piestikmi, kým zmes nebude homogénna. **Dôležitá poznámka**: *Pre každú rybu sa používajú nové piestiky.*

6. Vzorky sa umiestnia na ľad až do odstredenia pri teplote **4 °C** pri 50 000 g počas 30 minút.

7. Pipetou preneste dávky 20 – 50 µl (poznamenajte si množstvo) supernatantu **aspoň** do **dvoch** skúmaviek tak, že namočíte hrot pipety pod vrstvu tuku na povrchu a starostlivo odsajete supernatant bez tukových alebo peletových frakcií.

8. Skúmavky sa až do použitia skladujú pri teplote – 80 °C.

(*) *Homogenizačný tlmivý roztok:*

50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 % koktail inhibítorov proteázy (Sigma): 12 ml Tris-HCl, pH 7,4 + 120 µl koktailu inhibítorov proteázy (alebo ekvivalentného koktailu inhibítorov proteázy).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Koktail inhibítorov proteázy: Od firmy Sigma (pre tkanivo cicavcov), číslo produktu **P 8340**.

Poznámka: Homogenizačný tlmivý roztok by sa mal použiť v ten istý deň, ako bol vyrobený. Počas používania ho umiestnite na ľad.

Dodatok 6

Usmernenie na kvantifikáciu vitellogenínu z homogenátu hlavy a chvosta dánia pruhovaného (*danio rerio*) (upravené z holbecha a kol., 2001). možno použiť aj iné postupy využívajúce homológne protilátky a štandardy.

1. Mikrotitračné platne (certifikované Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Dánsko) potiahnuté 5 µg/ml IgG proti lipovitellínu dánia pruhovaného sa rozmrazia a trikrát premyjú premývacím tlmivým roztokom (*).

2. Purifikovaný štandardný roztok vitellogenínu dánia pruhovaného ([1]) sa sériovo zriedi na 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 a 20 ng/ml v riediacom tlmivom roztoku (**). Vzorky sa v riediacom tlmivom roztoku riedia aspoň 200-krát (aby nedošlo k efektu matrice) a aplikujú sa na platne. Kontrola skúšky sa aplikuje ako duplikát. Do každej jamky sa aplikuje 150 µl. Štandardy sa aplikujú v duplikátoch a vzorky v triplikátoch. Inkubujte cez noc pri teplote 4 °C na trepačke.

3. Platne sa päťkrát premyjú premývacím tlmivým roztokom. (*)

4. HRP pripojená k dextranovému reťazcu (napr. AMDEX A/S, Dánsko) a konjugované protilátky sa zriedia v premývacom tlmivom roztoku. Skutočné riedenie sa líši podľa šarže a veku. Do každej jamky sa aplikuje 150 µl a platne sa 1 hodinu inkubujú pri izbovej teplote na trepačke.

5. Platne sa päťkrát premyjú premývacím tlmivým roztokom (*) a spodok platní sa opatrne vyčistí etanolom.

6. Do každej jamky sa aplikuje 150 µl roztoku TMB plus (***). Platňu chráňte pred svetlom staniolom a sledujte vývoj farby na trepačke.

7. Keď sa plne vytvorí krivka štandardného roztoku, enzymatická aktivita sa zastaví pridaním 150 µl 0,2 M H_2SO_4 do každej jamky.

8. Absorbancia sa meria pri 450 nm (napr. na zariadení na čítanie platní Thermomax od spoločnosti Molecular Devices). Údaje sa analyzujú na pripojenom softvéri (napr. Softmax).

(*) Premývací tlmivý roztok:

PBS-stock (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Upravte pH na 7,3 a doplňte na 5 l milipórovej H_2O. Skladujte pri teplote 4 °C.

(**) Riediaci tlmivý roztok:

PBS-Stock****	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Upravte pH na 7,3 a doplňte na 1 l milipórovej H_2O. Skladujte pri teplote 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), purifikované podľa: 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 je ‚hotový' substrát vyrobený spoločnosťou KemEnTec (Dánsko). Je citlivý na svetlo. Skladujte pri teplote 4 °C.

(****) PBS stock

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Upravte pH na 6,8 a doplňte na 2 l milipórovou vodou. Skladujte pri izbovej teplote.

Dodatok 7

Usmernenie na prípravu rezov tkaniva na účely určenia pohlavia a štádia gonád

Účelom tohto oddielu je opísať postupy, ktoré sa vykonávajú pred hodnotením histologických rezov. Možno použiť aj iné postupy, ktoré vedú k podobnému určeniu pohlavia a štádia gonád.

Až na niekoľko výnimiek sú tieto postupy podobné pre medaku japonskú (JMD) a dánio pruhované (ZF).

Usmrtenie, pitva a fixácia tkaniva

Ciele:

1. Umožniť humánne usmrtenie rýb.

2. Získať potrebné telesné miery a hmotnosť.

3. Vyhodnotiť sekundárne pohlavné znaky.

4. Narezať tkanivá na analýzu VTG.

5. Zafixovať gonády.

Postupy:

1. Ryby by sa mali usmrtiť bezprostredne pred pitvou. Preto by sa naraz nemalo usmrcovať viacero rýb, pokiaľ nie je k dispozícií viacero prosektorov.

2. Ryba sa pomocou malej ponornej siete vyberie z pokusnej komory a v prepravnej nádobe prenesie na miesto pitvy.

3. Ryba sa umiestni do usmrcovacieho roztoku. Keď sa rybe zastaví dýchanie a prestane reagovať na vonkajšie podnety, vyberie sa z roztoku.

4. Odváži sa mokrá hmotnosť ryby.

5. Na prípravu tkanív na analýzu VTG sa ryba môže umiestniť na korkovú dosku na stolík disekčného mikroskopu.

   a) V prípade dánia pruhovaného sa hlava odreže bezprostredne za prsnou plutvou a chvost bezprostredne za chrbtovou plutvou.

   b) V prípade medaky japonskej sa brucho otvorí opatrne vedeným rezom po ventrálnej stredovej čiare od hrudného pletenca po bod tesne kraniálne od análneho otvoru. Pečeň sa opatrne vyberie pomocou malej pinzety a malých nožníc.

6. Vzorky na analýzu VTG sa umiestnia do Eppendorfových skúmaviek a ihneď sa zmrazia v tekutom dusíku.

7. Mŕtvy živočích vrátane gonád sa umiestni do označenej plastovej kazety na tkanivá, ktorá sa prenesie do Davidsonovho alebo Bouinovho fixačného prostriedku. Objem fixačného prostriedku by mal byť aspoň desaťnásobkom približného objemu tkanív. Fixačná nádoba sa jemne premiešava päť sekúnd, aby sa z kazety uvoľnili vzduchové bubliny.

8. a. Všetky tkanivá zostanú cez noc v Davidsonovom fixačnom prostriedku a nasledujúci deň sa prenesú do samostatných nádob s 10 % neutrálnym tlmeným formalínom. Nádoby s kazetami sa jemne premiešavajú 5 sekúnd, aby sa zabezpečil dostatočný prienik formalínu do kaziet.

   b. Tkanivá zostanú 24 hodín v Bouinovom fixačnom prostriedku a potom sa prenesú do 70 % etanolu.

Spracovanie tkanív

Ciele:

1. Dehydratovať tkanivo tak, aby sa zabezpečil dostatočný prienik parafínu.

2. Impregnovať tkanivo parafínom, aby sa zachovala celistvosť tkanív a vytvoril pevný povrch umožňujúci mikrotómiu.

Postupy:

3. Označené kazety s tkanivami sa vyberú z formalínu/etanolu a umiestnia do spracovacieho koša (spracovacích košov). Spracovací kôš sa vloží do prístroja na spracovanie tkaniva.

4. Zvolí sa harmonogram spracovania.

5. Po tom, ako prístroj na spracovanie tkaniva dokončil spracovací cyklus, kôš/koše sa môže/môžu preniesť do zalievacieho zariadenia.

Zalievanie

Cieľ:

Správne umiestniť vzorku do stuhnutého parafínu na účely mikrotómie.

Postupy:

1. Koše s kazetami sa vyberú z prístroja na spracovanie tkaniva a ponoria do prednej komory tepelnej konzoly zalievacieho zariadenia naplnenej parafínom alebo sa kazety prenesú do samostatného parafínového ohrievača.

2. Prvá kazeta, ktorá sa má zaliať, sa vyberie z prednej komory tepelnej konzoly alebo parafínového ohrievača. Kryt kazety sa odstráni a zlikviduje a označenie kazety sa porovná so záznamami o živočíchovi, aby sa pred zaliatím vyriešili prípadné nezrovnalosti.

3. Vyberie sa zalievacia forma vhodnej veľkosti.

4. Forma sa podrží pod výpustom dávkovacej konzoly a naplní roztaveným parafínom.

5. Vzorka sa vyberie z kazety a umiestni do roztaveného parafínu vo forme. To sa zopakuje so štyrmi až ôsmimi vzorkami pre každú parafínovú formu. Pozícia jednotlivých rýb sa označí tak, že ryba č. 1 sa natočí do 180 stupňov vzhľadom na ryby 2 – 4/8.

6. Pridá sa ďalší parafín na prekrytie vzorky.

7. Forma s kazetovou základňou sa umiestni na chladiacu platňu kryokonzoly.

8. Po stuhnutí parafínu sa blok (t. j. stvrdnutý parafín obsahujúci tkanivá a kazetovú základňu) vyberie z formy.

Mikrotómia

Cieľ:

Narezať a upevniť histologické rezy na účely farbenia.

Postupy:

1. Prvá fáza mikrotómie označovaná ako ‚približovanie' (facing) sa vykonáva takto:

   a) Parafínový blok sa umiestni do skľučovadla mikrotómu.

   b) Skľučovadlo sa posúva otáčaním kolieska mikrotómu, pričom sa z parafínového povrchu bloku odrezávajú hrubé rezy, kým nôž nedosiahne zaliate tkanivá.

c) Hrúbka rezu na mikrotóme sa nastaví na 3 – 5 mikrónov. Skľučovadlo sa posúva a z bloku sa odrežú viaceré rezy, aby sa odstránili prípadné artefakty vytvorené na reznom povrchu tkaniva pri hrubom rezaní.

d) Blok možno vybrať zo skľučovadla a položiť prednou stranou nadol na ľad, aby tkanivo nasiaklo.

2. Ďalšou fázou mikrotómie je konečné rezanie a pripevnenie rezov tkaniva na podložné sklíčka. Tieto postupy sa vykonávajú takto:

a) Ak bol blok uložený na ľade, sníme sa z ľadu a znova sa vloží do skľučovadla mikrotómu.

b) Hrúbka rezu na mikrotóme sa nastaví na 3 – 5 mikrónov a skľučovadlo sa posúva otáčaním kolieska mikrotómu. Z bloku sa odrezávajú rezy, kým sa nevytvorí ‚prúžok' obsahujúci aspoň jeden prijateľný rez s gonádami. (Podľa potreby možno počas rezania blok vybrať zo skľučovadla, položiť na ľad, aby tkanivo nasiaklo, a znova vložiť do skľučovadla.)

c) Rezy sa vodorovne uložia na povrch vody vo vodnom kúpeli. Ideálne je získať aspoň jeden rez bez záhybov a zachytených vzduchových bublín na spodku.

d) Pod najlepší rez sa ponorí podložné mikroskopické sklíčko, pomocou ktorého sa rez vyberie z vody. Tento proces sa označuje ako ‚pripevňovanie' rezu na podložné sklíčko.

e) Pre každý súbor rýb sa pripravia tri rezy. Druhý a tretí rez sa urobia v odstupoch 50 mikrónov od prvého rezu. Ak sú ryby zaliate tak, že ich gonády nie sú v rovnakej úrovni rezu, treba urobiť viac rezov, aby sa z každej ryby získalo aspoň šesť rezov s gonádami.

f) Perom na označovanie podložných sklíčok sa na sklíčko napíše číslo bloku, z ktorého sa podložné sklíčko vyrobilo.

g) Podložné sklíčko sa umiestni do farbiaceho stojana.

h) Blok sa vyberie zo skľučovadla a položí prednou stranou nadol na účely skladovania.

Farbenie, zakrytie krycím sklíčkom a označenie podložného sklíčka

Ciele:

— Zafarbiť rezy na histopatologické vyšetrenie.

— Trvalo zakryť pripevnené a zafarbené tkanivá.

— Trvalo identifikovať zafarbené rezy spôsobom, ktorý umožňuje úplnú vysledovateľnosť.

Postupy:

1. Farbenie

a) Pred farbením sa podložné sklíčka cez noc vysušia vzduchom.

b) Rezy sa zafarbia hematoxylín-eozínom.

2. Zakrytie krycím sklíčkom

a) Krycie sklíčka možno uložiť ručne alebo automaticky.

b) Podložné sklíčko sa ponorí do xylénu alebo prostriedku TissueClear. Nadbytočné množstvo xylénu/prostriedku TissueClear sa opatrne strasie z podložného sklíčka.

c) Približne 0,1 ml upevňovacieho média sa aplikuje do blízkosti konca podložného sklíčka oproti matnému koncu alebo na krycie sklíčko.

d) Pri ukladaní na podložné sklíčko sa krycie sklíčko nakloní pod ostrým uhlom.

3. Označovanie

a) Každé označenie podložného sklíčka by malo obsahovať tieto informácie.

i) Názov laboratória

ii) Druh

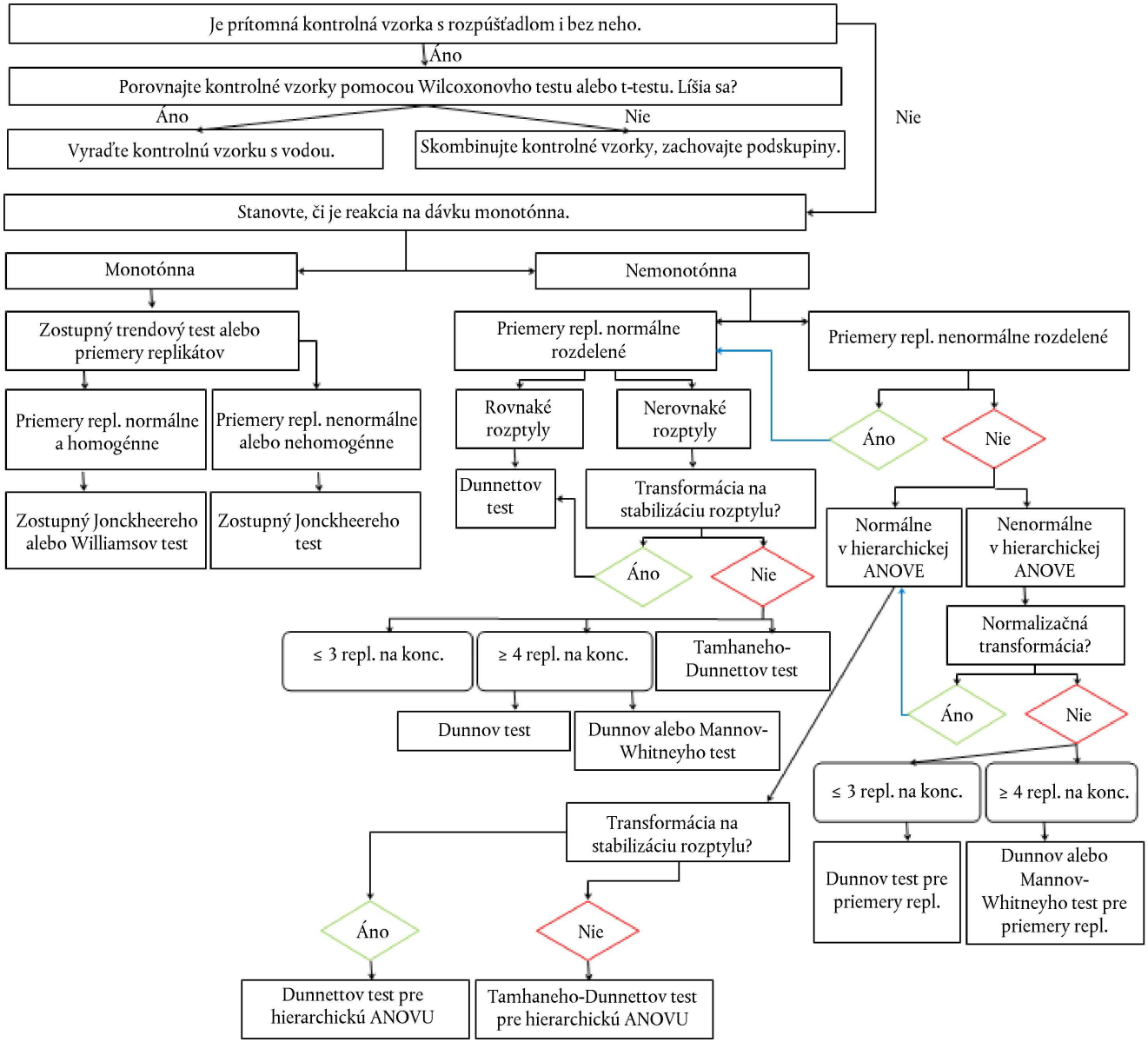
iii) Č. vzorky/č. sklíčka

iv) Chemikália/skupina s danou koncentráciou

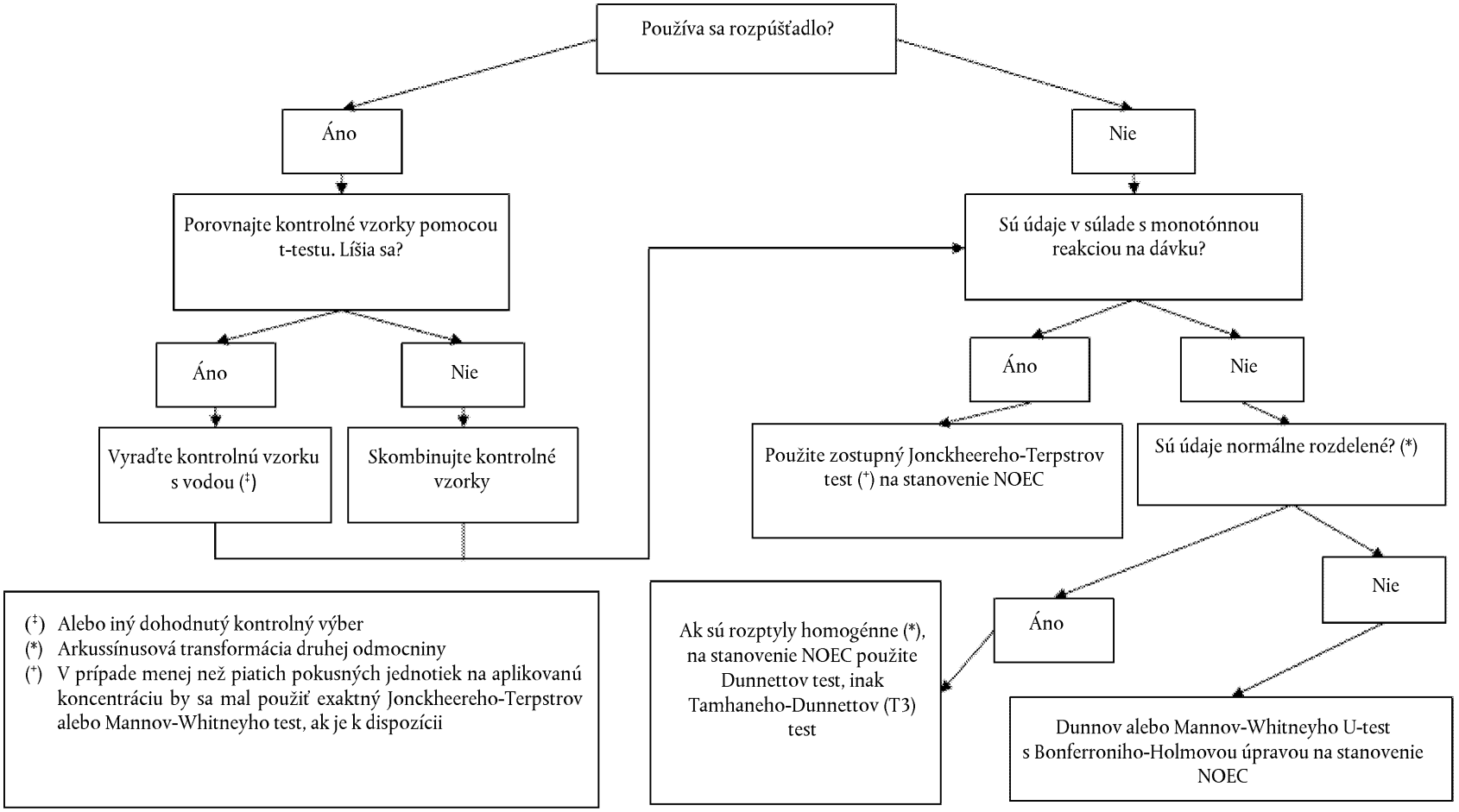
v) Dátum

Dodatok 8

Štatistická schéma pre analýzu vitellogenínu



Štatistická schéma pre analýzu pomeru pohlaví



(‡) Alebo iný dohodnutý kontrolný výber
(*) Arkussínusová transformácia druhej odmocniny
(†) V prípade menej než piatich pokusných jednotiek na aplikovanú koncentráciu by sa mal použiť exaktný Jonckheereho-Terpstrov alebo Mannov-Whitneyho test, ak je k dispozícii

s

Dodatok 9

Usmernenie na odber vzoriek tkanív na účely určenia genetického pohlavia a na účely určenia genetického pohlavia metódou PCR

Odber vzoriek tkanív, ich príprava a skladovanie pred určením genetického pohlavia metódou PCR pri medake (pripravené Laboratóriom pre vodné organizmy spoločnosti Bayer CropScience AG)

1. Jemnými nožnicami sa odstrihne análna alebo chrbtová plutva každej jednotlivej ryby a umiestni sa do skúmavky naplnenej 100 µl extrakčného tlmivého roztoku 1 (podrobnosti o príprave tlmivého roztoku nájdete ďalej). Nožnice sa po každej rybe vyčistia v kadičke naplnenej destilovanou vodou a usušia papierovou vreckovkou.

2. Tkanivá z plutiev sa následne homogenizujú mikrotrubičkovým teflónovým piestikom, aby sa dosiahla lýza buniek. Pre každú skúmavku sa použije nový piestik, aby nedošlo ku kontaminácii. Piestiky sa cez noc umiestnia do 0,5 M NaOH, 5 minút sa oplachujú v destilovanej vode a až do ich použitia sa skladujú v etanole alebo sterilnom prostredí po sterilizácii v autokláve.

3. Tkanivo z plutvy možno skladovať aj bez extrakčného tlmivého roztoku 1 na suchom ľade a potom v chladničke pri teplote – 80 °C, aby nedošlo k degenerácii DNA. Extrakcia však funguje lepšie, ak sa zároveň extrahuje DNA (pokyny na manipuláciu sú uvedené vyššie, vzorky sa po skladovaní pri teplote – 80 °C majú pred naplnením tlmivého roztoku do skúmaviek rozmraziť na ľade).

4. Po homogenizácii sa všetky skúmavky umiestnia do vodného kúpeľa a varia 15 minút pri teplote 100 °C.

5. Potom sa do každej skúmavky pipetou pridá 100 µl extrakčného tlmivého roztoku 2 (podrobnosti o príprave tlmivého roztoku nájdete ďalej). Vzorky sa 15 minút skladujú pri izbovej teplote a v priebehu skladovania sa občas jemne pretrepú rukou.

6. Potom sa všetky skúmavky znova umiestnia do vodného kúpeľa a varia 15 minút pri teplote 100 °C.

7. Až do ďalšej analýzy sa skúmavky zmrazia na teplotu – 20 °C.

Príprava tlmivého roztoku

Tlmivý roztok na PCR 1:

500 mg N-lauroylsarkozínu (napr. Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko),

2 ml 5 M NaCl,

pridajte 100 ml dest. H_2O

→ sterilizujte v autokláve.

Tlmivý roztok na PCR 2:

20 g Chelex (napr. Biorad, Mníchov, Nemecko),

nechajte nasiaknuť v 100 ml dest. H_2O

→ sterilizujte v autokláve.

Určenie genetického pohlavia metódou PCR pri medake (pripravené Laboratóriom pre vodné organizmy spoločnosti Bayer CropScience AG a centrom Universität Würzburg Biozentrum)

Pripravené a zmrazené skúmavky (opísané v predchádzajúcom oddiele) sa rozmrazia na ľade. Potom sa odstredia s použitím Eppendorfovej odstredivky (30 s pri max. rýchlosti pri izbovej teplote). Na analýzu PCR sa použije čistý supernatant oddelený od zrazeniny. Je bezpodmienečne nevyhnutné zabrániť tomu, aby sa akékoľvek stopy látky Chelex (nachádzajúce sa na zrazenine) preniesli do reakcie PCR, lebo to naruší pôsobenie ‚Taq'-polymerázy. Supernatant sa použije priamo alebo sa môže skladovať zmrazený (– 20 C) a na účely ďalších analýz sa môže znova rozmraziť vo viacerých cykloch bez toho, aby to malo negatívny vplyv na DNA.

1. *Príprava ‚reakčnej zmesi' (25 µl na vzorku):*

	Objem	Konečná koncentrácia
Templátová DNA	0,5 µl – 2 µl	
10 × tlmivý roztok na PCR s $MgCl_2$	2,5 µl	1x
Nukleotidy (každý spomedzi dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Priamy primer (10 µM) (pozri ďalej 3 – 5)	0,5 µl	200 nM
Reverzný primer (10 µM) (pozri ďalej 3 – 5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Voda (kvalita na PCR)	do 25 µl	
Taq E-polymeráza	0,3 µl	1,5 U

10 × tlmivý roztok na PCR s $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 pri 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$, 0,1 % Tween 20

Na každú analýzu PCR (pozri ďalej 3 – 5) je potrebný špeciálny primer ako nová kombinácia ‚reakčnej zmesi' a primeraného potrebného množstva templátovej DNA pre každú vzorku (pozri vyššie). Príslušné objemy sa pipetami prenesú do nových skúmaviek. Potom sa všetky skúmavky uzavrú, premiešajú (približne 10 s) a odstredia (10 s pri izbovej teplote). Teraz možno spustiť príslušné programy PCR. Okrem toho sa v každom programe PCR použije pozitívna kontrolná vzorka (exemplárna vzorka DNA so známym pôsobením a jasnými výsledkami) a negatívna kontrolná vzorka (1 µl dest. vody).

2. *Príprava agarózového gélu (1 %) – počas vykonávania programov PCR:*

— Rozpustite 3 g agarózy v 300 ml tlmivého roztoku 1 × TAE (1 % agarózový gél).

— Tento roztok sa musí povariť v mikrovlnnej rúre (približne 2 – 3 min.).

— Preneste horúci roztok do špeciálnej odlievacej schránky, ktorá leží na ľade.

— Po približne 20 min. je agarózový gél pripravený na použitie.

— Agarózový gél skladujte v tlmivom roztoku 1 × TAE až do konca programov PCR.

3. *Aktínový program PCR:*

Účelom tejto reakcie PCR je preukázať, že DNA vo vzorke nie je poškodená.

— Špeciálny primer:

‚Mact1(horný/priamy)' → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

‚Mact2(spodný/reverzný)' → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 min. pri 95 °C

Cyklus (35-krát):

Denaturácia → 45 s pri 95 °C

Teplotná hybridizácia → 45 s pri 56 °C

Elongácia → 1 min. pri 68 °C

15 min. pri 68 C

4. *Program PCR na detekciu génov na chromozómoch X a Y*

V tomto programe PCR sa vzorky neporušenej DNA použijú na detekciu génov na chromozómoch X a Y. V samčej DNA by sa mal ukázať jeden dvojitý pás a v samičej DNA jeden jednotlivý pás (po zafarbení a gélovej elektroforéze). V tomto programe by sa mala analyzovať aj jedna pozitívna kontrolná vzorka pre samčekov (vzorka XY) a jedna pre samičky (vzorka XX).

— Špeciálny primer:

‚PG 17.5' (horný/priamy) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

‚PG 17.6' (dolný/reverzný) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 min. pri 95 °C

Cyklus (40-krát):

Denaturácia	→ 45 s pri 95 °C
Teplotná hybridizácia	→ 45 s pri 55 °C
Elongácia	→ 1 min. 30 s pri 68 °C

15 min. pri 68 °C

5. *Program PCR na detekciu génov na chromozóme Y ako ‚kontrola' pre program PCR na detekciu génov na chromozómoch X a Y*

Pomocou tohto programu PCR sa overujú výsledky programu PCR na detekciu génov na chromozómoch X a Y. Na samčích vzorkách by sa mal ukázať jeden pás a na samičích vzorkách by sa nemal ukázať žiadny pás (po zafarbení a gélovej elektroforéze).

— Špeciálny primer:

‚DMTYa (horný/priamy)' → GGC CGG GTC CCC GGG TG

‚DMTYd (dolný/reverzný)' → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 min. pri 95 °C

Cyklus (40-krát):

Denaturácia	→ 45 s pri 95 °C
Teplotná hybridizácia	→ 45 s pri 56 °C
Elongácia	→ 1 min. pri 68 °C

15 min. pri 68 °C

6. *Farbenie vzoriek PCR:*

Farbiaci roztok:

50 % glycerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % brómfenolová modrá

0,25 % xylén kyanol

Pipetou aplikujte 1 µl farbiaceho roztoku do každej skúmavky.

7. *Spustenie gélovej elektroforézy:*

— Pripravený 1 % agarózový gél sa prenesie do komory na gélovú elektroforézu naplnenej tlmivým roztokom 1 × TAE.

— 10 – 15 µl z každej zafarbenej vzorky PCR sa pipetou nanesie na príslušné miesto na agarózovom géle.

— Na samostatné miesto sa pipetou nanesie 5 – 15 µl roztoku 1kb-‚Ladder'(Invitrogen).

— Spustite elektroforézu pri 200 V.

— Po 30 – 45 minútach ju zastavte.

8. *Určenie pásov:*

— Vyčistite agarózový gél v destilovanej vode.

— Následne preneste agarózový gél do ethídiumbromidu na 15 – 30 minút.

— Potom sa má urobiť snímka agarózového gélu v UV svetelnej komore.

— Vzorky sa napokon analyzujú porovnaním s pozitívnym kontrolným pásom (alebo pásmi) a rebríkom (‚ladder').

Dodatok 10

Usmernenie na odber vzoriek tkanív na účely určenia genetického pohlavia metódou pcr pri pichľavke sivej

Odber vzoriek tkanív a extrakcia DNA

DNA možno extrahovať pomocou rôznych komerčne dostupných reaktantov a manuálnych i automatizovaných extrakčných systémov. Ďalej je opísaný protokol používaný v laboratóriu Cefas Weymouth a podľa potreby sú uvedené aj alternatívne prístupy.

1. Pomocou jemných nožníc sa z každej ryby oddelí malá časť tkaniva (10 – 20 mg) z dorzolaterálnej oblasti (po odstránení hlavy a chvosta na analýzu VTG). Tkanivo sa vloží do skúmavky a buď sa priamo umiestni do tekutého dusíka (na účely skladovania pri teplote – 80 °C), alebo sa skúmavka naplní 70 % etanolom (na účely prepravy a následného skladovania pri teplote – 4 °C). Nožnice sa po každej rybe vyčistia v 70 % etanole a potom v destilovanej vode a usušia papierovou vreckovkou.

2. Etanol (ak je prítomný) sa odstráni odsatím a tkanivo sa nechá cez noc digerovať proteinázou K v 400 µl tlmivého roztoku ATL (Qiagen). Alikvotná časť (200 µl) digerovaného tkaniva sa prenesie na 96-jamkový S-blok (Qiagen) a DNA sa vyextrahuje v 96-jamkovom formáte pomocou systému Qiagen Universal BioRobot a súpravy QIamp Investigator BioRobot Kit. DNA sa eluuje v 50 µl vody bez DNázy a RNázy. Ak sa na extrakciu DNA používajú tvrdé tkanivá (napr. chrbtica alebo prsná plutva), môže byť potrebné homogenizovať vzorku v lyzačnom tlmivom roztoku pomocou nástroja na lýzu tkaniva FastPrep® alebo ekvivalentného systému na disrupciu tkaniva.

   Alternatíva:

   a) Tkanivo sa nechá cez noc digerovať proteinázou K v 400 µl lyzačného tlmivého roztoku G2 (Qiagen). DNA sa vyextrahuje z 200 µl digerovaného tkaniva buď pomocou súpravy EZ-1 DNA Easy Tissue Kit a systému EZ-1 Biorobot, alebo pomocou súpravy DNA Easy Tissue Mini Kit. DNA sa eluuje v objeme 50 µl.

   b) Tkanivá sa spracujú pomocou reaktanta DNAzol. Vzorky tkaniva sa 10 minút lyzujú v 1 ml DNAzolu v 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavke a potom sa odstreďujú pri 13 000 ot./min. počas 5 minút, aby sa odstránili všetky tuhé častice. Lyzovaná vzorka sa následne prenesie do novej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky obsahujúcej 500 µl 100 % etanolu v kvalite vhodnej na molekulárne analýzy a potom sa odstreďuje pri 13 000 ot./min. počas 10 minút, aby sa vyzrážala DNA. Etanol sa odstráni a nahradí 400 µl 70 % etanolu v kvalite vhodnej na molekulárne analýzy, vzorka sa odstreďuje pri 13 000 ot./min. počas 5 minút a peleta DNA sa rozpustí v 50 µl vody bez DNázy a RNázy vhodnej na molekulárne analýzy. Znova platí, že ak sa používajú tvrdé tkanivá (prsná plutva), pred extrakciou DNA môže byť potrebné homogenizovať vzorku v lyzačnom tlmivom roztoku pomocou nástroja na lýzu tkaniva FastPrep® alebo ekvivalentného systému na disrupciu tkaniva.

3. DNA sa až do použitia skladuje pri teplote – 20 °C.

Dôležitá poznámka: počas postupov sa musia používať rukavice.

Analýza pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR)

Vykonajú sa amplifikácie pomocou 2,5 µl extraktu DNA v reakčnom objeme 50 µl pomocou primerov pre lokus Idh (opis: Peichel a kol., 2004. Current Biology 1:1416 – 1424):

Priamy primer 5′ GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3′

Reverzný primer 5’ TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3’

Vhodné reaktanty na PCR dodávajú mnohí dodávatelia. Metóda uvedená ďalej sa v súčasnosti používa v laboratóriu Cefas Weymouth.

1. *Príprava ‚reakčnej zmesi' (50 µl na vzorku):*

Ďalej je opísaný spôsob prípravy hlavnej zmesi. Možno ju pripraviť vopred a skladovať zmrazenú pri teplote – 20 °C až do použitia. Pripravte dostatočné množstvo hlavnej zmesi na negatívnu kontrolnú vzorku (len s použitím vody v kvalite vhodnej na molekulárne biologické analýzy).

	Objem (zásobný konc.)/ vzorku	Konečná koncentrácia
Reakčný tlmivý roztok 5xGoTaq®	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (každý 25 mM)	každý 250 µM
Priamy primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Reverzný primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Voda v kvalite vhodnej na molekulárne biologické analýzy	30,75 µl	
GoTaq-polymeráza	0,25 µl	1,25 U

— Pridajte 47,5 µl do označenej 0,5 ml tenkostennej skúmavky na PCR.

— Pridajte 2,5 µl purifikovanej DNA do príslušne označenej skúmavky. Zopakujte pre všetky vzorky a negatívnu kontrolnú vzorku.

— Prekryte dvoma kvapkami minerálneho oleja. Alternatívne možno použiť termocyklér s vyhrievaným krytom.

— Uzavrite kryty.

— Vzorky sa denaturovali v termocykléri Peltier PTC-225 pri teplote 94 C ± 2 °C počas 5 minút, potom nasledovalo 39 cyklov pri teplote 94 °C ± 2 °C počas 1 minúty, 55 °C ± 2 °C počas 1 minúty, 72 °C ± 2 C počas 1 minúty a záverečné predĺženie pri teplote 72 °C ± 2 C počas 10 minút.

2. *Príprava agarózového gélu (2 %):*

Tradične sa produkty PCR interpretujú na 20 % agarózovom géle obsahujúcom ethídiumbromid.

Možno použiť aj kapilárne elektroforetické systémy.

— Navážte 2 g agarózy do 100 ml tlmivého roztoku 1 × TAE.

— Zahrejte v mikrovlnnej rúre (približne 2 – 3 min.), aby sa agaróza rozpustila.

— Pridajte dve kvapky ethídiumbromidu s konečnou koncentráciou 0,5 µg/ml.

— Preneste horúci roztok do zariadenia na odlievanie gélu.

— Nechajte gél stvrdnúť.

3. *Gélová elektroforéza:*

— Preneste agarózový gél do zariadenia na elektroforézu a ponorte do tlmivého roztoku 1 × TAE.

— Pridajte 20 µl z každej vzorky do samostatnej jamky a do náhradnej jamky pridajte marker molekulovej hmotnosti (DNA rebrík 100bp, Promega).

— Elektroforéza sa vykonáva pri 120 V počas 30 – 45 minút.

4. *Vizualizácia produktov amplifikácie*

Ak bol do agarózového gélu pridaný ehtídiumbromid podľa opisu uvedeného vyššie, produkty DNA sa vizualizujú pod zdrojom UV žiarenia. Alternatívne sa agarózový gél pred vizualizáciou zafarbí pokrytím gélu zriedeným roztokom ethídiumbromidu (0,5 µg/ml vo vode) na 30 minút.

Dodatok 11

Usmernenie pre postup umelého oplodnenia pichľavky sivej

Účelom tohto oddielu je opísať postupy na získanie oplodnených vajíčok pichľavky sivej na použitie v teste FSDT.

Postupy

Získanie spermií od samčekov

1. Dobre sfarbený samček z požadovanej populácie sa usmrtí.

2. Z každej strany ryby sa odoberú semenníky. *Semenníky sú väčšinou výrazne pigmentované štruktúry tvaru tyče, ktoré sú dobre viditeľné v laterálnej stredovej línii tela*. Použite jednu z týchto metód:

3. Pomocou jemných nožníc urobte rez s dĺžkou 1 – 1,5 cm jedným strihnutím od kloaky v uhle približne 45 stupňov.

4. Skalpelom urobte malý rez na bočnej strane ryby mierne za panvou a mierne ventrálne od bočných štítkov.

5. Jemnou pinzetou vyberte semenníky a vložte ich do Petriho misky.

6. Každý semenník sa pokryje 100 µl čerstvo vyrobeného **Hankovho konečného roztoku** (*).

7. Semenníky sa nakrájajú na malé kocky pomocou žiletky alebo skalpela. Tým sa uvoľnia spermie a Hankov roztok získa mliečny vzhľad.

8. Tekutina obsahujúca spermie sa pridá do skúmavky, pričom treba dávať pozor, aby sa pri pipetovaní nedostali do skúmavky kúsky semenníkov.

9. Do skúmavky sa pridá 800 µl Hankovho konečného roztoku a dobre sa premieša.

10. Ak je to potrebné, samčeka možno zafixovať v 100 % etanole alebo inom požadovanom fixačnom prostriedku. To je dôležité najmä vtedy, keď sa v štúdii určuje rodičovský pôvod mláďat.

(*) Hankov tlmený soľný roztok (HBSS):

Roztok HBSS je potrebný na uchovanie spermií počas prípravy na oplodnenie.

Dôležitá poznámka: *Hoci väčšinu potrebných zásobných roztokov možno pripraviť vopred,* ***zásobný roztok 5*** *a následne aj* ***konečný roztok*** *by sa mali pripraviť čerstvé v deň použitia.*

Zásobný roztok 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilovaná voda (DV)	100 ml

Zásobný roztok 2

Na_2HPO_4 (bezvodý)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
DV	100 ml

Zásobný roztok 3

$CaCl_2$	0,72 g
DV	50 ml

Zásobný roztok 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
DV	50 ml

Zásobný roztok 5 (čerstvo pripravený)

$NaHCO_3$	0,35 g
DV	10 ml

Poznámka: Ak už máte pripravené niektoré z uvedených solí, ale s iným obsahom vody (t. j. $2H_2O$ namiesto bezvodých), môžete ich použiť, najskôr však upravte hmotnosť na základe molekulovej hmotnosti.

V prípade Hankovho konečného roztoku ich kombinujte v tomto poradí:

zásobný roztok 1	1,0 ml
zásobný roztok 2	0,1 ml
zásobný roztok 3	0,1 ml
DV	8,6 ml
zásobný roztok 4	0,1 ml
zásobný roztok 5	0,1 ml

Pred použitím dobre premiešajte.

Oplodnenie

1. V požadovanej populácii sa identifikujú veľké gravidné samičky. Samičky sú pripravené na vytláčanie až vtedy, keď vidíte vajíčka vyčnievať z kloaky. Pripravené samičky majú typickú polohu ‚hlava hore'.

2. Jemne prejdite prstom alebo palcom po bočnej strane ryby smerom k chvostu, aby ste podporili vypudenie vačku s vajíčkami do novej Petriho misky. Zopakujte to aj na druhej strane a vráťte rybu do nádrže.

3. Vajíčka možno rozptýliť (aby tvorili jednu vrstvu) pomocou jemného štetca. Je dôležité snažiť sa vystaviť spermiám čo najviac vajíčok, preto je užitočné maximalizovať povrchovú plochu vajíčok. Dôležitá poznámka: Uchovávajte vajíčka vlhké tak, že okolo nich uložíte vlhkú vreckovku (je dôležité, aby sa vajíčka priamo nedotýkali vody, lebo to môže viesť k predčasnému stvrdnutiu choriónu, čím by sa znemožnilo oplodnenie). Existujú veľké rozdiely v počte vajíčok, ktoré sú jednotlivé samičky schopné vytvoriť, ale v priemere možno z jednej gravidnej samičky ľahko získať približne 150 vajíčok.

4. 25 µl spermií v Hankovej zmesi sa štetcom rovnomerne rozotrie na celý povrch vajíčok. Vajíčka po začiatku oplodňovania rýchlo stvrdnú a zmenia farbu (do minúty). Ak je odhadovaný počet vajíčok vyšší ako 150, postup zopakujte. Podobne ak vajíčka nestvrdnú do jednej minúty, pridajte trochu viac spermií. Dôležitá poznámka: Pridaním väčšieho množstva spermií sa nemusí nevyhnutne zvýšiť miera oplodnenia.

5. Vajíčka a roztok spermií by sa mali nechať ‚interagovať' aspoň 15 minút a oplodnené vajíčka by sa mali umiestniť do expozičných akvárií do 1,5 hodiny od oplodnenia.

6. Postup sa opakuje s použitím ďalšej samičky, kým sa nezíska želaný počet vajíčok.

7. Odložte si niekoľko vajíčok z poslednej dávky a zafixujte ich v 10 % kyseline octovej.

Počítanie a rozdelenie vajíčok do testovacích akvárií

1. Vajíčka by sa mali rovnomerne rozdeliť medzi jednotlivé úrovne koncentrácie chemikálie, aby sa zabránilo genetickému skresleniu. Každá dávka oplodnených vajíčok by sa mala rozdeliť na skupiny rovnakej veľkosti (v rovnakom počte ako úrovne koncentrácie chemikálie) pomocou tupého nástroja (t. j. entomologickej pinzety s tupou čepeľou alebo inokulačnej kľučky). Ak chcete použiť štyri replikáty na testovanú koncentráciu po 20 vajíčkach, musíte do každého expozičného akvária umiestniť 80 vajíčok. Dôležitá poznámka: Odporúča sa pridať ďalších 20 % (t. j. celkovo 96 vajíčok na úroveň koncentrácie chemikálie), aby ste si boli istí, že dosiahnete 100 % mieru oplodnenia.

2. Vajíčka pichľavky sú mimo hniezda stráženého otcom veľmi náchylné na plesňové infekcie. V tejto súvislosti má rozhodujúci význam ošetrovanie všetkých vajíčok metylénovou modrou počas prvých piatich dní testu. Zásobný roztok metylénovej modrej sa pripraví v koncentrácii 1 mg/ml a pridá sa do expozičných akvárií, aby sa dosiahla maximálna konečná koncentrácia 2,125 mg/l. Dôležitá poznámka: Pichľavky by sa po vyliahnutí nemali vystavovať metylénovej modrej, takže v 6. deň by ju systém už nemal obsahovať.

3. Vajíčka sa každý deň kontrolujú a všetky mŕtve alebo neoplodnené vajíčka sa zaznamenajú. Dôležitá poznámka: Vajíčka sa až do vyliahnutia nikdy nesmú dostať mimo vodu, a to ani na veľmi krátke obdobie.

C.42 **BIODEGRADOVATEĽNOSŤ V MORSKEJ VODE**

VŠEOBECNÝ ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 306 (1992). Keď sa vyvíjali pôvodné testovacie metódy, nebolo známe, do akej miery možno výsledky skríningových testov ľahkej biodegradovateľnosti s použitím pitnej vody a výtoku splaškových vôd alebo aktivovaného kalu ako inokula uplatniť v morskom prostredí. V tejto súvislosti sa získali rôznorodé výsledky [napr. (1)].

2. Mnohé priemyselné odpadové vody obsahujúce rôzne chemikálie sa dostávajú do mora buď priamym vypúšťaním, alebo prostredníctvom ústí riek, v ktorých je čas zotrvania nízky v porovnaní s časom potrebným na úplnú biodegradáciu mnohých chemických látok. Vzhľadom na rastúcu informovanosť o potrebe chrániť morské prostredie pred zvyšovaním chemickej záťaže a o potrebe odhadnúť pravdepodobnú koncentráciu chemikálií v mori sa vyvinuli testovacie metódy týkajúce sa biodegradovateľnosti v morskej vode.

3. Opísané metódy využívajú prírodnú morskú vodu ako vodnú fázu aj ako zdroj mikroorganizmov. V snahe dosiahnuť súlad s metódami stanovenia ľahkej biodegradovateľnosti v sladkej vode sa skúmalo použitie ultrafiltrovanej a odstredenej morskej vody, ako aj použitie morských sedimentov ako inokula. Tieto skúmania boli neúspešné. Testovacím médiom je teda prírodná morská voda, ktorá sa predupravila odstránením hrubých častíc.

4. Na posúdenie úplnej biodegradovateľnosti metódou trepačkovej banky je nutné použiť pomerne vysoké koncentrácie testovanej látky vzhľadom na nízku citlivosť analytickej metódy využívajúcej rozpustený organický uhlík (DOC). To si následne vyžaduje, aby sa do morskej pridali minerálne živiny (N a P), ktorých nízke koncentrácie by inak obmedzili elimináciu DOC. Živiny sa musia pridať aj v prípade metódy uzavretej fľaše z dôvodu koncentrácie pridanej testovanej látky.

5. Z toho vyplýva, že metódy nie sú testy ľahkej biodegradovateľnosti, lebo okrem mikroorganizmov, ktoré sú už prítomné v morskej vode, sa nepridáva žiadne inokulum. Testy ani nesimulujú morské prostredie, lebo sa pridávajú živiny a koncentrácia testovanej látky je oveľa vyššia, ako by bola v mori. Z týchto dôvodov sa metódy uvádzajú v novom pododdiele s názvom ‚Biodegradovateľnosť v morskej vode'.

UPLATŇOVANIE

6. Prvé informácie o biodegradovateľnosti v morskej vode poskytujú výsledky testov, ktoré by sa použili v prípade, keď model používania a likvidácie predmetnej látky nasvedčuje dráhe do mora. Ak je výsledok kladný (> 70 % eliminácia DOC, > 60 % ThOD – teoretická spotreba kyslíka), možno dospieť k záveru, že existuje potenciál pre biodegradáciu v morskom prostredí. Záporný výsledok však nevylučuje tento potenciál, ale naznačuje, že je potrebná ďalšia štúdia, napríklad s použitím čo najnižšej koncentrácie testovanej látky.

7. V každom prípade, ak sa vyžaduje presnejšia hodnota miery alebo stupňa biodegradácie v morskej vode na konkrétnom mieste, je nutné použiť ďalšie zložitejšie a dokonalejšie, a teda aj nákladnejšie metódy. Napríklad by bolo možné použiť simulačný test s použitím koncentrácie testovanej látky bližšej predpokladanej koncentrácii v životnom prostredí. Takisto je možné použiť neobohatenú a nepredupravenú morskú vodu z miesta záujmu a po primárnej biodegradácii sa môže vykonať špecifická chemická analýza. Na stanovenie úplnej biodegradovateľnosti by bolo potrebné použiť látky označené uhlíkom ^{14}C, aby bolo možné odmerať mieru zániku rozpustného organického uhlíka ^{14}C a produkciu $^{14}CO_2$ v realistických koncentráciách v životnom prostredí.

VÝBER METÓD

8. Výber použitej metódy závisí od viacerých faktorov. Ako pomôcku pri výbere možno použiť nasledujúcu tabuľku. Látky s rozpustnosťou vo vode nižšou ako ekvivalent približne 5 mg C/l síce nemožno testovať metódou trepačkovej banky, ale v zásade možno tieto slabo rozpustné látky testovať aspoň metódou uzavretej fľaše.

Tabuľka

Výhody a nevýhody testu trepačkovej banky a testu uzavretej fľaše

METÓDA	VÝHODY	NEVÝHODY
TREPAČKOVÁ BANKA	— jednoduché prístroje okrem analyzátora C — dĺžka trvania 60 dní nie je problém — žiadny vplyv nitrifikácie — možno upraviť pre prchavé látky	— potreba analyzátora C — využíva 5 – 40 mg DOC/1, môže mať inhibujúce účinky — stanovenie DOC je ťažké pri nízkych koncentráciách v morskej vode (chloridový efekt) — koncentrácia DOC v morskej vode je niekedy vysoká
UZAVRETÁ FĽAŠA	— jednoduché prístroje — jednoduché konečné stanovenie — použitie nízkej koncentrácie testovanej látky (2 mg/l), takže menšie riziko inhibície — ľahko upraviteľné pre prchavé látky	— môže byť ťažké zachovať vzduchotesnosť fliaš — rast baktérií na stenách môže viesť k nesprávnym hodnotám — hodnoty spotreby O_2 v slepých vzorkách môžu byť vysoké najmä po 28 dňoch, čo možno prekonať zrením morskej vody — možný vplyv spotreby O_2 nitrifikáciou

METÓDA TREPAČKOVEJ BANKY

ÚVOD

1. Táto metóda je variantom modifikovaného skríningového testu OECD opísaného v kapitole C.4 B tejto prílohy (2), v ktorom sa používa morská voda. Vypracovala sa na základe kruhového testu, ktorý pre Európsku komisiu (EK) uskutočnil dánsky Ústav pre kvalitu vody (3).

2. Tak ako v prípade sprievodnej metódy uzavretej fľaše pre morskú vodu, výsledky tohto testu sa nepovažujú za ukazovatele ľahkej biodegradovateľnosti, ale majú sa použiť najmä na získanie informácií o biodegradovateľnosti látok v morskom prostredí.

PRINCÍP METÓDY

3. Vopred stanovené množstvo testovanej látky sa rozpustí v testovacom médiu, aby sa získala koncentrácia 5 – 40 mg rozpusteného organického uhlíka (DOC)/l. Ak sa limity citlivosti analýz organického uhlíka zlepšia, môže byť výhodné použiť nižšie koncentrácie testovanej látky, najmä v prípade inhibujúcich látok. Roztok testovanej látky v testovacom médiu sa inkubuje za pretrepávania v tme alebo pri difúznom osvetlení v aeróbnych podmienkach pri stabilnej teplote (regulovanej na ± 2 °C), ktorá zvyčajne bude v rozsahu 15 – 20 °C. V prípadoch, keď je cieľom štúdie simulovať situácie v životnom prostredí, sa testy môžu uskutočniť aj mimo tohto zvyčajného rozsahu teplôt. Odporúčaná maximálna dĺžka trvania testu je približne 60 dní. Po degradácii nasledujú merania DOC (úplná degradácia) a v niektorých prípadoch aj špecifická analýza (primárna degradácia).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

4. Na to, aby bolo možné určiť, či sa test môže použiť na konkrétnu látku, musia byť známe niektoré jej vlastnosti. Musí sa stanoviť obsah organického uhlíka látky, jej prchavosť musí byť taká, aby v priebehu testu nedochádzalo k významným stratám, a jej rozpustnosť vo vode musí byť vyššia ako ekvivalent 25 – 40 mg C/l. Testovaná látka by sa navyše nemala výrazne adsorbovať na sklenené povrchy. Potrebné sú informácie o čistote alebo pomernom zastúpení hlavných zložiek testovanej látky, aby bolo možné interpretovať získané výsledky, a to najmä v prípade, že výsledok je blízko ‚úspešnej' úrovne.

5. Informácie o toxicite testovanej látky pre baktérie, napríklad údaje namerané v krátkodobých testoch rýchlosti spotreby kyslíka (4), môžu byť užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácií a môžu byť rozhodujúce pre správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie. Tieto informácie však nie sú vždy dostatočné na interpretáciu výsledkov získaných v teste na biologickú odbúrateľnosť a vhodnejší je postup opísaný v bode 18.

REFERENČNÉ LÁTKY

6. Na kontrolu mikrobiálnej činnosti vo vzorke morskej vody sa musia použiť vhodné referenčné látky. Príkladmi látok, ktoré možno použiť na tieto účely, sú benzoan sodný, octan sodný a anilín. Referenčné látky sa musia degradovať v primerane krátkom čase, v opačnom prípade sa odporúča, aby sa test zopakoval s použitím inej vzorky morskej vody.

7. V kruhovom teste EK, v ktorom sa vzorky morskej vody odobrali z rôznych miest a v rôznych obdobiach roka (3), trvala lag fáza (t_L) jeden až štyri dni a čas na dosiahnutie 50 % degradácie (t_{50}) okrem lag fázy bol jeden až sedem dní pre benzoan sodný. Pre anilín sa hodnota t_L pohybovala od nula do desať dní, kým hodnota t_{50} bola v rozsahu jeden až desať dní.

OPAKOVATEĽNOSŤ A CITLIVOSŤ METÓDY

8. Opakovateľnosť metódy sa stanovila v kruhovom teste (3). Najnižšiu koncentráciu testovanej látky, pre ktorú možno túto metódu použiť s analýzou DOC, vo veľkej miere určuje detekčný limit analýzy organického uhlíka (v súčasnosti približne 0,5 mg C/l) a koncentrácia rozpusteného organického uhlíka v použitej morskej vode (zvyčajne rádovo 3 – 5 mg/l pre vodu z otvoreného mora). Koncentrácia DOC v pozadí by nemala presiahnuť približne 20 % celkovej koncentrácie DOC po pridaní testovanej látky. Ak to nie je uskutočniteľné, koncentráciu DOC v pozadí možno niekedy znížiť tak, že morská voda sa pred testom nechá zrieť. Ak sa metóda používa len so špecifickou chemickou analýzou (ktorou sa meria primárna degradácia), výskumník musí uviesť dodatočné informácie o tom, či možno očakávať úplnú degradáciu. Tieto dodatočné informácie môžu zahŕňať výsledky iných testov ľahkej alebo inherentnej biodegradovateľnosti.

OPIS METÓDY

Prístroje

9. Bežné laboratórne zariadenie a:

a) trepačka prispôsobená na pollitrové až dvojlitrové Erlenmeyerove banky, buď s automatickou reguláciou teploty, alebo umiestnená v miestnosti so stabilnou teplotou 15 – 20 °C regulovanou v rozmedzí ± 2 °C;

b) pollitrové až dvojlitrové Erlenmeyerove banky s úzkym hrdlom;

c) zariadenie na membránovú filtráciu alebo odstredivka;

d) membránové filtre 0,2 – 0,45 µm;

e) analyzátor uhlíka;

f) zariadenie na špecifickú analýzu (voliteľné).

Morská voda

10. Odoberte vzorku morskej vody do dôkladne vyčistenej nádoby a dopravte ju do laboratória najlepšie do jedného alebo dvoch dní od odberu. Počas prepravy nedovoľte, aby teplota vzorky výrazne presiahla teplotu, aká sa použije v teste. Presne identifikujte miesto odberu vzorky a opíšte jeho stav z hľadiska znečistenia a živín. Najmä v prípade pobrežných vôd zahrňte do tejto charakterizácie počet heterotrofných mikrobiálnych kolónií a stanovenie koncentrácie rozpustených dusičnanov, amónnych iónov a fosforečnanov.

11. O samotnej vzorke morskej vody uveďte tieto informácie:

— dátum odberu,

— hĺbka odberu,

— vzhľad vzorky – zakalená atď.,

— teplota v čase odberu,

— slanosť,

— DOC,

— čas medzi odberom a použitím v teste.

12. Ak sa zistí vysoký obsah DOC vo vzorke morskej vody (bod 8), odporúča sa, aby sa morská voda nechala pred použitím zrieť približne jeden týždeň. Nechajte ju zrieť za aeróbnych podmienok pri testovacej teplote a v tme alebo pri difúznom osvetlení. Ak je to potrebné, udržiavajte aeróbne podmienky jemným prevzdušňovaním. Počas zretia sa zníži obsah ľahko degradovateľného organického materiálu. V kruhovom teste (3) sa nezistili žiadne rozdiely medzi degradačným potenciálom vyzretých a čerstvo odobratých vzoriek morskej vody. Pred použitím predupravte morskú vodu tak, aby sa odstránili hrubé častice, napr. filtráciou cez nylonový filter alebo hrubý papierový filter (nie membránový ani GF-C filter) alebo sedimentáciou a dekantáciou. Použitý postup sa musí uviesť do správy. Ak nechávate vzorku zrieť, túto predúpravu vykonajte až potom.

Zásobné roztoky minerálnych živín

13. Pripravte tieto zásobné roztoky s použitím reaktantov analytickej čistoty:

a)	Dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4	21,75 g
	Dihydrát hydrogénfosforečnanu disodného, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Chlorid amónny, NH_4Cl	0,50 g
	Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.	
b)	Chlorid vápenatý, $CaCl_2$	27,50 g
	Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.	
c)	Heptahydrát síranu horečnatého, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.	
d)	Hexahydrát chloridu železitého, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.	

Zrazeninám v roztoku d) možno predísť pridaním jednej kvapky koncentrovanej HCl alebo 0,4 g kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA, disodná soľ) na liter. Ak sa v zásobnom roztoku vytvorí zrazenina, nahraďte ho čerstvo pripraveným roztokom.

Príprava testovacieho média

14. Pridajte 1 ml každého z uvedených zásobných roztokov na liter predupravenej morskej vody.

Inokulum

15. Okrem mikroorganizmov, ktoré sú už prítomné v morskej vode, nepridávajte osobitné inokulum. Stanovte (voliteľne) počet heterotrofov tvoriacich kolónie v testovacom médiu morskej vody (a podľa možnosti aj v pôvodných vzorkách morskej vody), napr. spočítaním na miske s použitím morského agaru. To je potrebné najmä pre vzorky z pobrežných alebo znečistených oblastí. Skontrolujte heterotrofnú mikrobiálnu činnosť v morskej vode vykonaním testu s referenčnou látkou.

Príprava baniek

16. Zabezpečte, aby bolo všetko sklo pred použitím dôkladne čisté, nie nevyhnutne sterilné (napr. s použitím alkoholovej kyseliny chlorovodíkovej), opláchnuté a vysušené, aby sa zabránilo kontaminácii zvyškami z predchádzajúcich testov. Banky sa takisto pred prvým použitím musia vyčistiť.

17. Testované látky v duplicitných bankách vyhodnocujte spolu s jednou bankou pre referenčnú látku. Vykonajte slepý test v duplikáte bez testovanej či referenčnej látky s cieľom stanoviť analytické slepé vzorky. Rozpustite testované látky v testovacom médiu – možno ich pohodlne pridať prostredníctvom koncentrovaného zásobného roztoku – aby sa dosiahla požadovaná počiatočná koncentrácia zvyčajne 5 – 40 mg DOC/l. Referenčnú látku otestujte vo zvyčajnej počiatočnej koncentrácii zodpovedajúcej 20 mg DOC/l. Ak sa používajú zásobné roztoky testovanej a/alebo referenčnej látky, zabezpečte, aby sa výrazne nezmenila slanosť média morskej vody.

18. Ak možno očakávať alebo nemožno vylúčiť toxické účinky, môže byť vhodné zahrnúť do koncepcie testu inhibičný pokus v duplikáte. Pridajte testovanú a referenčnú látku do rovnakej nádoby, pričom koncentrácia referenčnej látky je zvyčajne rovnaká ako v kontrolnom teste (t. j. 20 mg DOC/l), aby sa umožnilo porovnanie.

19. Pridajte primerané množstvá testovaných roztokov do Erlenmeyerových baniek (vhodné množstvo je najviac polovica objemu banky) a na každú banku nasaďte voľný kryt (napr. hliníkovú fóliu), ktorý umožňuje výmenu plynov medzi bankou a okolitým vzduchom. (Ak sa používa analýza DOC, vatové uzávery sú nevhodné.) Vložte nádoby do trepačky a počas celého testu nepretržite pretrepávajte pri miernej rýchlosti (napr. 100 ot./min.). Regulujte teplotu (15 – 20 °C v rozmedzí ± 2 °C) a chráňte nádoby pred svetlom, aby sa zabránilo rastu rias. Zabezpečte, aby vzduch neobsahoval toxické materiály.

Fyzikálno-chemický kontrolný test (voliteľný)

20. Ak existuje podozrenie na abiotickú degradáciu alebo mechanizmy straty, ako je hydrolýza (problém len v prípade špecifickej analýzy), prchanie alebo adsorpcia, odporúča sa vykonať fyzikálno-chemický kontrolný pokus. Možno ho vykonať pridaním chloridu ortutnatého ($HgCl_2$) ([1]) (50 – 100 mg/l) do nádob s testovanou látkou, aby sa zastavila mikrobiálna činnosť. Významný pokles hodnoty DOC alebo koncentrácie konkrétnej látky vo fyzikálno-chemickom kontrolnom teste nasvedčuje existencii mechanizmov abiotickej eliminácie. (Ak sa použije chlorid ortutnatý, pozornosť v analýze DOC by sa mala venovať interferenciám alebo otrave katalyzátorom).

Počet baniek

21. V typickom teste sa použijú tieto banky:

banky 1 a 2 – obsahujúce testovanú látku (testovaciu suspenziu),

banky 3 a 4 – obsahujúce len morskú vodu (slepé),

banka 5 – obsahujúca referenčnú látku (kontrola postupu),

banka 6 – obsahujúca testovanú a referenčnú látku (kontrola toxicity) – voliteľná,

banka 7 – obsahujúca testovanú látku a sterilizačné činidlo (abiotická sterilná kontrola) – voliteľná.

Analýza DOC

22. V priebehu testu odoberajte vo vhodných intervaloch vzorky na analýzu DOC (dodatok 1). Vždy odoberte vzorky na začiatku testu (0. deň) a v 60. deň. Na opis priebehu degradácie v čase je potrebných celkovo minimálne päť vzoriek. Nemožno uviesť žiadny pevný harmonogram odberu vzoriek, lebo miera biodegradácie sa líši. Na každej vzorke vykonajte stanovenie DOC v duplikáte.

([1]) Chlorid ortutnatý ($HgCl_2$) je veľmi toxická látka, s ktorou by sa malo manipulovať za vhodných preventívnych opatrení. Vodné odpady obsahujúce túto chemikáliu by sa mali vhodným spôsobom zlikvidovať, nemali by sa teda vypúšťať do systému odpadových vôd.

Odber vzoriek

23. Požadovaný objem vzoriek závisí od analytickej metódy (špecifická analýza), použitého analyzátora uhlíka a postupu (membránová filtrácia alebo odstredenie) zvolených na úpravu vzorky pred stanovením uhlíka (body 25 a 26). Pred odberom vzoriek zabezpečte, aby bolo testovacie médium dobre premiešané a aby sa prípadný materiál prilepený na stene banky rozpustil alebo suspendoval.

24. Membránovú filtráciu alebo odstredenie vykonajte ihneď po odbere vzorky. Ak je to potrebné, filtrované alebo odstredené vzorky skladujte pri teplote 2 – 4 °C maximálne 48 hodín alebo pri teplote nižšej ako –18 °C v prípade dlhšieho skladovania (ak je známe, že to nebude mať vplyv na testovanú látku, pred uskladnením roztok okyslite na pH 2).

25. Membránové filtre (0,2 – 0,45 µm) sú vhodné, ak sa zabezpečí, aby neuvoľňovali uhlík ani neadsorbovali látku vo fáze filtrácie, napr. polykarbonátové membránové filtre. Niektoré membránové filtre sú impregnované povrchovo aktívnymi látkami na hydrofilizáciu a môžu uvoľňovať značné množstvo rozpusteného uhlíka. Tieto filtre pripravte prevarením v deionizovanej vode v troch po sebe nasledujúcich hodinových intervaloch. Po prevarení skladujte filtre v deionizovanej vode. Prvých 20 ml filtrátu zlikvidujte.

26. Ako alternatívu k membránovej filtrácii možno vykonať odstredenie vzoriek. Odstreďujte pri 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) počas 15 minút, podľa možnosti v chladenej centrifúge.

Poznámka: Oddelenie celkového obsahu organického uhlíka (TOC) od DOC (TOC/DOC) odstreďovaním nefunguje pri veľmi nízkych koncentráciách, lebo buď sa neodstránia všetky baktérie, alebo sa uhlík ako súčasť bakteriálnej plazmy znovu rozpustí. Pri vyšších testovaných koncentráciách (> 10 mg C na liter) je chyba odstreďovania pomerne nižšia.

Frekvencia odberu vzoriek

27. Ak sa analýzy vykonávajú ihneď po odbere vzoriek, čas ďalšieho odberu vzoriek určite s ohľadom na výsledok analytického stanovenia.

28. Ak sa vzorky konzervujú (bod 24) na neskoršiu analýzu, odoberte viac vzoriek ako požadovaný minimálny počet päť. Najskôr analyzujte posledné vzorky, pričom postupným ‚spätným' výberom vhodných vzoriek na analýzu možno s pomerne malým počtom analytických stanovení získať dobrý opis biodegradačnej krivky. Ak do konca testu nedošlo k žiadnej degradácii, nie je potrebné analyzovať žiadne ďalšie vzorky, a v takej situácii môže ‚spätná' stratégia ušetriť značné náklady na analýzu.

29. Ak sa plató degradačnej krivky pozoruje pred 60. dňom, test ukončite. Ak degradácia zjavne začala do 60. dňa, ale nedosiahla plató, predĺžte experiment o ďalšie obdobie.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

30. Zaznamenajte analytické výsledky na priloženú kartu údajov (dodatok 2) a vypočítajte hodnoty biodegradácie pre testovanú a referenčnú látku podľa rovnice:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

kde:

D_t = degradácia ako percentuálna eliminácia DOC alebo špecifickej látky v čase t,

C_o = počiatočná koncentrácia DOC alebo špecifickej látky v testovacom médiu,

C_t = koncentrácia DOC alebo špecifickej látky v testovacom médiu v čase t,

$C_{bl(0)}$ = počiatočná koncentrácia DOC alebo špecifickej látky v slepej vzorke,

$C_{bl(t)}$ = koncentrácia DOC alebo špecifickej látky v slepej vzorke v čase t.

31. Degradáciu uveďte ako percentuálnu elimináciu DOC (úplnú degradáciu) alebo elimináciu špecifickej látky (primárnu degradáciu) v čase t. Vypočítajte koncentrácie DOC s presnosťou na 0,1 mg na liter a priemery hodnôt D_t zaokrúhlite na najbližšie celé percento.

32. Priebeh degradácie graficky znázornite v diagrame uvedenom na obrázku v oddiele ‚Validita a interpretácia výsledkov'. Ak máte dostatok údajov, vypočítajte z krivky lag fázu (t_L) a čas potrebný na dosiahnutie 50 % eliminácie od konca lag fázy (t_{50}).

Protokol o skúške

33. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje.

Podmienky testu:

— umiestnenie a opis miesta odberu vzoriek, stav znečistenia a živín (počet kolónií, dusičnany, amóniové ióny, fosforečnany, ak je to vhodné),

— charakteristiky vzorky [dátum odberu vzorky, hĺbka, vzhľad, teplota, slanosť, DOC (voliteľné), čas medzi odberom a použitím v teste],

— použitá metóda zretia morskej vody (ak sa použije),

— metóda použitá na predúpravu (filtrácia/sedimentácia) morskej vody,

— metóda použitá na stanovenie DOC,

— metóda použitá na špecifickú analýzu (voliteľné),

— metóda použitá na určenie počtu heterotrofov v morskej vode (metóda počítania na miske alebo alternatívny postup) (voliteľné),

— iné metódy (voliteľné) použité na stanovenie vlastností morskej vody (merania ATP atď.).

Výsledky:

— analytické údaje uvedené na karte údajov (dodatok 2),

— priebeh testu degradácie sa graficky znázorňuje v diagrame zobrazujúcom lag fázu (t_L), sklon a čas (od konca lag fázy) na dosiahnutie 50 % eliminácie (t_{50}). Lag fázu možno graficky odhadnúť podľa obrázka v oddiele ‚Validita a interpretácia výsledkov' alebo jednoducho uviesť ako čas potrebný na 10 % degradáciu,

— percentuálna degradácia odmeraná po 60 dňoch alebo na konci testu.

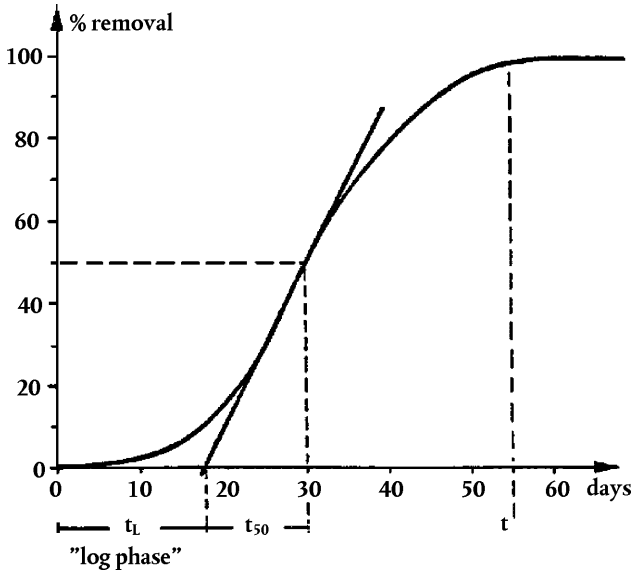
Rozbor výsledkov

Validita a interpretácia výsledkov

34. Výsledky získané použitím referenčných látok, napr. benzoanu sodného, octanu sodného alebo anilínu, by mali byť porovnateľné s výsledkami získanými v kruhovom teste (3) (pozri oddiel ‚Referenčné látky', bod 7). Ak sú výsledky získané s použitím referenčných látok atypické, test by sa mal zopakovať s použitím inej vzorky morskej vody. Hoci interpretácia výsledkov testov inhibície nemusí byť vždy jednoduchá vzhľadom na príspevok testovanej látky k DOC, výrazné zníženie celkovej miery eliminácie DOC v porovnaní s kontrolnou vzorkou je pozitívnou známkou toxických účinkov.

35. Vzhľadom na pomerne vysoké použité testované koncentrácie v porovnaní s väčšinou prírodných systémov (a teda nepriaznivý pomer medzi koncentráciami testovaných látok a iných zdrojov uhlíka) sa metóda má považovať za predbežnú skúšku, ktorú možno použiť na stanovenie, či látka je alebo nie je ľahko biodegradovateľná. V súlade s tým ani nízky výsledok nemusí nutne znamenať, že testovaná látka nie je biodegradovateľná v morskom prostredí, ale poukazuje na to, že na stanovenie tejto skutočnosti je potrebné vykonať ďalší výskum.

Na nasledujúcom obrázku je uvedený príklad teoretického pokusu s degradáciou, ktorý znázorňuje uskutočniteľný spôsob odhadu hodnôt t_L (dĺžka ‚lag fázy') a t_{50} (časový interval začínajúci pri t_L potrebný na dosiahnutie 50 % eliminácie).



METÓDA UZAVRETEJ FĽAŠE

ÚVOD

1. Táto metóda je variantom testu uzavretej fľaše (5) s morskou vodou. Vypracovala sa na základe kruhového testu, ktorý pre Európsku komisiu (EK) uskutočnil dánsky Ústav pre kvalitu vody (3).

2. Tak ako v prípade sprievodnej metódy trepačkovej banky pre morskú vodu, výsledky tohto testu sa nepovažujú za ukazovatele ľahkej biodegradovateľnosti, ale majú sa použiť najmä na získanie informácií o biodegradovateľnosti látok v morskom prostredí.

PRINCÍP METÓDY

3. Vopred stanovené množstvo testovanej látky sa rozpustí v testovacom médiu v koncentrácii zvyčajne 2 – 10 mg testovanej látky na liter (možno použiť jednu alebo viac koncentrácií). Tento roztok sa uchováva v naplnenej uzavretej fľaši v tme v kúpeli alebo v komore s konštantnou teplotou regulovanou na ± 1 °C v rozsahu 15 – 20 °C. V prípadoch, keď je cieľom štúdie simulovať situácie v životnom prostredí, sa testy môžu uskutočniť aj mimo tohto normálneho rozsahu teplôt za predpokladu, že sa vhodne upraví regulácia teploty. Po degradácii nasleduje analýza kyslíka počas 28-dňového obdobia.

4. V kruhovom teste sa ukázalo, že ak test trval dlhšie ako 28 dní, vo väčšine prípadov sa nezískali žiadne užitočné informácie v dôsledku závažných interferencií. Hodnoty biochemickej spotreby kyslíka (BSK) v slepých vzorkách boli príliš vysoké pravdepodobne v dôsledku rastu na stenách spôsobeného nedostatkom miešania a v dôsledku nitrifikácie. Odporúčaná dĺžka je preto 28 dní, ale ak hodnota BSK v slepých vzorkách zostane v rámci hranice 30 % (body 15 a 40), test sa môže predĺžiť.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

5. Na to, aby bolo možné určiť, či sa test môže použiť na konkrétnu látku, musia byť známe niektoré jej vlastnosti. Vyžaduje sa empirický vzorec na výpočet teoretickej spotreby kyslíka (ThOD) (pozri dodatok 3). Ak nie je k dispozícii, musí sa stanoviť chemická spotreba kyslíka (ChSK) látky, ktorá bude slúžiť ako referenčná hodnota. Použitie ChSK je menej uspokojivé, lebo niektoré látky sa v teste ChSK úplne neoxidujú.

6. Rozpustnosť látky by mala byť aspoň 2 mg/l, hoci v zásade možno testovať aj menej rozpustné látky (napr. pomocou ultrazvuku), ako aj prchavé látky. Potrebné sú informácie o čistote alebo pomernom zastúpení hlavných zložiek testovanej látky, aby bolo možné interpretovať získané výsledky, a to najmä v prípade, že výsledok je blízko ‚úspešnej' úrovne.

7. Informácie o toxicite látky pre baktérie, napríklad údaje namerané v krátkodobých testoch spotreby kyslíka (4), môžu byť veľmi užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácií a môžu byť rozhodujúce na správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie. Tieto informácie však nie sú vždy dostatočné na interpretáciu výsledkov získaných v teste na biologickú odbúrateľnosť a vhodnejší je postup opísaný v bode 27.

REFERENČNÉ LÁTKY

8. Na kontrolu mikrobiálnej činnosti vo vzorke morskej vody sa musia použiť vhodné referenčné látky. Na tieto účely možno použiť (napríklad) anilín, octan sodný či benzoan sodný. V rozumnom čase musí dôjsť k aspoň 60 % (z ich ThOD) degradácii týchto látok, inak sa odporúča, aby sa test zopakoval s použitím inej vzorky morskej vody.

9. V kruhovom teste EK, v ktorom sa vzorky morskej vody odobrali z rôznych miest a v rôznych obdobiach roka, trvala lag fáza (t_L) 0 – 2 dni a čas na dosiahnutie 50 % degradácie (t_{50}) okrem lag fázy bol 1 – 4 dni pre benzoan sodný. Pre anilín bola hodnota t_L 0 – 7 dní a hodnota t_{50} 2 – 12 dní.

REPRODUKOVATEĽNOSŤ

10. Opakovateľnosť metód sa stanovila v kruhovom teste EK (3).

OPIS METÓDY

Prístroje

11. Bežné laboratórne vybavenie a:

a) možno použiť 250 – 300 ml fľaše na meranie BSK so sklenenými uzávermi alebo 250 ml fľaše s úzkym hrdlom so sklenenými uzávermi;

b) viaceré dvojlitrové, trojlitrové a štvorlitrové fľaše s litrovými značkami na prípravu pokusu a na naplnenie fliaš na meranie BSK;

c) vodný kúpeľ alebo miestnosť s konštantnou teplotou na udržiavanie fliaš pri konštantnej teplote (± 1 °C) s vylúčením svetla;

d) zariadenie na analýzu rozpusteného kyslíka;

e) membránové filtre 0,2 – 0,45 µm (voliteľné);

f) zariadenie na špecifickú analýzu (voliteľné).

Morská voda

12. Odoberte vzorku morskej vody do dôkladne vyčistenej nádoby a prepravte ju do laboratória najlepšie do jedného alebo dvoch dní od odberu. Počas prepravy nedovoľte, aby teplota vzorky výrazne presiahla teplotu, aká sa použije v teste.

13. Presne identifikujte miesto odberu vzorky a opíšte jeho stav z hľadiska znečistenia a živín. Najmä v prípade pobrežných alebo znečistených vôd zahrňte do tejto charakterizácie počet heterotrofných mikrobiálnych kolónií a stanovenie koncentrácie rozpustených dusičnanov, amónnych iónov a fosforečnanov.

14. O samotnej vzorke morskej vody uveďte tieto informácie:

— dátum odberu,

— hĺbka odberu,

— vzhľad vzorky – zakalená atď.,

— teplota v čase odberu,

— slanosť,

— rozpustený organický uhlík (DOC),

— čas medzi odberom a použitím v teste.

15. Ak sa zistí vysoký obsah DOC vo vzorke alebo ak sa usúdi, že hodnota BSK v slepej vzorke by po 28 dňoch bola vyššia ako 30 % hodnoty referenčných látok, odporúča sa, aby sa morská voda nechala pred použitím zrieť približne jeden týždeň.

16. Nechajte vzorku zrieť za aeróbnych podmienok pri testovacej teplote a v tme alebo pri difúznom osvetlení. Ak je to potrebné, udržiavajte aeróbne podmienky jemným prevzdušňovaním. Počas zretia sa zníži obsah ľahko degradovateľného organického materiálu. V kruhovom teste (3) sa nezistili žiadne rozdiely medzi degradačným potenciálom vyzretých a čerstvo odobratých vzoriek morskej vody.

17. Pred použitím predupravte morskú vodu tak, aby sa odstránili hrubé častice, napr. filtráciou cez nylonový filter alebo hrubý papierový filter (nie membránový ani GF-C filter) alebo sedimentáciou a dekantáciou. Použitý postup uveďte do správy. Ak nechávate vzorku zrieť, túto predúpravu vykonajte až potom.

Zásobné roztoky minerálnych živín

18. Pripravte tieto zásobné roztoky s použitím reaktantov analytickej čistoty:

a)	Dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4	21,75 g
	Dihydrát hydrogénfosforečnanu disodného, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Chlorid amónny, NH_4Cl	0,50 g
	Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.	
b)	Chlorid vápenatý, $CaCl_2$	27,50 g
	Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.	

c) Heptahydrát síranu horečnatého, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.

d) Hexahydrát chloridu železitého, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.

Zrazeninám v roztoku d) možno predísť pridaním jednej kvapky koncentrovanej HCl alebo 0,4 g kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA, disodná soľ) na liter. Ak sa v zásobnom roztoku vytvorí zrazenina, nahraďte ho čerstvo pripraveným roztokom.

Príprava testovacieho média

19. Pridajte 1 ml každého z uvedených zásobných roztokov na liter predupravenej morskej vody. Nasýťte testovacie médium vzduchom pri testovacej teplote metódou prevzdušňovania čistým stlačeným vzduchom počas približne 20 minút. Stanovte koncentráciu rozpusteného kyslíka na účely kontroly. Nasýtenú koncentráciu rozpusteného kyslíka ako funkciu slanosti a teploty možno odčítať z nomogramu priloženého k tejto testovacej metóde (dodatok 4).

Inokulum

20. Okrem mikroorganizmov, ktoré sú už prítomné v morskej vode, nepridávajte osobitné inokulum. Stanovte (voliteľne) počet heterotrofov tvoriacich kolónie v testovacom médiu morskej vody (a podľa možnosti aj v pôvodnej vzorke morskej vody), napr. spočítaním na miske s použitím morského agaru. To je potrebné najmä pre vzorky z pobrežných alebo znečistených oblastí. Skontrolujte heterotrofnú mikrobiálnu činnosť v morskej vode vykonaním testu s referenčnou látkou.

Príprava testovacích fliaš

21. Vykonajte všetky potrebné úpravy vrátane zretia a predúpravy morskej vody pri zvolenej testovacej teplote 15 – 20 °C, pričom zabezpečte čistotu, ale nie sterilnosť, všetkého skla.

22. Pripravte skupiny fliaš na stanovenie BSK testovanej a referenčnej látky v sérii súbežných pokusov. Všetky analýzy vykonajte v duplicitných fľašiach (slepé vzorky, referenčná a testovaná látka), t. j. pripravte dve fľaše pre každé stanovenie. Analýzy vykonajte minimálne v 0., 5., 15. a 28. deň (štyri stanovenia). Na účely analýz kyslíka si štyri stanovenia vyžadujú celkovo 3 × 2 × 4 = 24 fliaš (slepá vzorka, referenčná a testovaná látka), a teda približne 8 litrov testovacieho média (na jednu koncentráciu testovanej látky).

23. Pripravte samostatné roztoky testovanej a referenčnej látky vo veľkých fľašiach s dostatočným objemom (bod 11) tak, že najskôr pridáte testovanú a referenčnú látku do čiastočne naplnených veľkých fliaš buď priamo, alebo prostredníctvom koncentrovaného zásobného roztoku. Pridajte ďalšie testovacie médium, aby sa dosiahli požadované konečné koncentrácie. Ak sa používajú zásobné roztoky testovanej a/alebo referenčnej látky, zabezpečte, aby sa výrazne nezmenila slanosť média morskej vody.

24. Koncentrácie testovanej a referenčnej látky zvoľte s ohľadom na:

a) rozpustnosť rozpusteného kyslíka v morskej vode pri použitej testovacej teplote a slanosti (pozri priložený nomogram – dodatok 4);

b) hodnotu BSK morskej vody v slepej vzorke a

c) očakávanú biodegradovateľnosť testovanej látky.

25. Pri teplotách 15 °C a 20 °C a slanosti 32 promile (oceánska voda) je rozpustnosť rozpusteného kyslíka približne 8,1, resp. 7,4 mg/l. Ak sa morská voda nenechá zrieť, spotreba kyslíka samotnej morskej vody (spotreba kyslíka v slepej vzorke) môže byť 2 mg O_2/l alebo vyššia. Preto s cieľom zabezpečiť značnú koncentráciu kyslíka, ktorý zostane po oxidácii testovanej látky, použite počiatočnú koncentráciu testovanej látky približne 2 – 3 mg/l (v závislosti od hodnoty ThOD) pre látky, pri ktorých sa očakáva, že sa úplne degradujú za podmienok testu (napr. referenčné látky). Menej degradovateľné látky testujte pri vyšších koncentráciách až do približne 10 mg/l za predpokladu, že sa neprejavia toxické účinky. Môže byť výhodné vykonať súbežné testy s nízkou (približne 2 mg/l) a vysokou (približne 10 mg/l) koncentráciou testovanej látky.

26. Súbežne sa musí stanoviť kyslíková slepá vzorka vo fľašiach bez testovanej alebo referenčnej látky.

27. Ak sa majú stanoviť inhibičné účinky, pripravte túto sériu roztokov v samostatných veľkých fľašiach (bod 13):

a) 2 mg na liter ľahko degradovateľnej látky, napr. ktorejkoľvek z uvedených referenčných látok;

b) x mg na liter testovanej látky (x je zvyčajne 2);

c) 2 mg na liter ľahko degradovateľnej látky plus x mg na liter testovanej látky.

Fyzikálno-chemický kontrolný test (voliteľný)

28. Ak sa využije možnosť špecifických analýz, možno vykonať fyzikálno-chemický pokus na kontrolu, či sa testovaná látka eliminuje abiotickými mechanizmami, napr. hydrolýzou alebo adsorpciou. Fyzikálno-chemický kontrolný test možno vykonať pridaním chloridu ortutnatého ($HgCl_2$) ([1]) (50 – 100 mg/l) do duplicitných baniek s testovanou látkou, aby sa zastavila mikrobiálna činnosť. Významný pokles koncentrácie konkrétnej látky v priebehu testu nasvedčuje existencii mechanizmov abiotickej eliminácie.

Počet fliaš na meranie BSK v typickom teste

29. V typickom teste sa použijú tieto fľaše:

— aspoň osem fliaš obsahujúcich testovanú látku,

— aspoň osem fliaš obsahujúcich len morskú vodu obohatenú živinami,

— aspoň osem fliaš obsahujúcich referenčnú látku a podľa potreby

— šesť fliaš obsahujúcich testovanú a referenčnú látku (kontrola toxicity).

POSTUP

30. Po príprave ihneď odčerpajte každý roztok zo spodnej štvrtiny (nie z dna) príslušnej veľkej fľaše a naplňte príslušnú skupinu fliaš na meranie BSK. Ihneď analyzujte nulové kontrolné vzorky (v čase nula) z hľadiska rozpusteného kyslíka (bod 33) alebo ich uchovajte na neskoršiu chemickú analýzu vyzrážaním s $MnCl_2$ (chlorid mangánatý) a NaOH (hydroxid sodný).

31. Inkubujte zvyšné paralelné fľaše na meranie BSK pri testovacej teplote (15 – 20 °C) v tme. Vo vhodných časových intervaloch (napr. po 5., 15. a 28. dni ako minimum) vyberte fľaše z inkubácie a analyzujte rozpustený kyslík (bod 33).

32. Špecifické analýzy vzoriek (voliteľné) vykonajte s použitím membránového filtra (0,2 – 0,45 µm) alebo odstredenia počas 15 minút. Ak sa vzorky neanalyzujú ihneď, skladujte maximálne 48 hodín pri teplote 2 – 4 °C alebo dlhšie pri teplote –18 °C (ak je známe, že to nebude mať vplyv na testovanú látku, pred uskladnením roztok okyslite na pH 2).

Stanovenie rozpusteného kyslíka

33. Stanovte koncentráciu rozpusteného kyslíka chemickou alebo elektrochemickou metódou, ktorá je uznaná na vnútroštátnej alebo medzinárodnej úrovni.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

34. Analytické výsledky zaznamenajte do priložených kariet údajov (dodatok 5).

([1]) Chlorid ortutnatý ($HgCl_2$) je veľmi toxická látka, s ktorou by sa malo manipulovať za vhodných preventívnych opatrení. Vodné odpady obsahujúce túto chemikáliu by sa mali vhodným spôsobom zlikvidovať, nemali by sa teda vypúšťať priamo do systému odpadových vôd.

35. Vypočítajte BSK ako rozdiel v spotrebe kyslíka medzi slepou vzorkou a roztokom testovanej látky za podmienok testu. Vydeľte čistú spotrebu kyslíka koncentráciou (hmotnosť/objem) látky s cieľom vyjadriť hodnotu BSK ako mg BSK/mg testovanej látky. Degradácia je vymedzená ako pomer biochemickej spotreby kyslíka buď k teoretickej spotrebe kyslíka (ThOD), ak je to možné, alebo k chemickej spotrebe kyslíka (ChSK) a je vyjadrená ako percento (pozri bod 36).

36. Vypočítajte hodnoty biodegradácie v každom čase odberu vzoriek pre testovanú i referenčnú látku pomocou jednej z týchto rovníc:

$$\%\ biodegradácie = \frac{mg\ O_2/mg\ \ testovanej\ látky}{mg\ ThOD/mg\ \ testovanej\ látky} \times 100$$

$$\%\ biodegradácie = \frac{mg\ O_2/mg\ \ testovanej\ látky}{mg\ COD/mg\ \ testovanej\ látky} \times 100$$

kde:

ThOD = teoretická spotreba kyslíka (výpočet v dodatku 3),

ChSK = chemická spotreba kyslíka, stanovená experimentálne.

Poznámka: Niekedy sa týmito dvoma spôsobmi výpočtu (percento ThOD alebo percento ChSK) nezískajú rovnaké výsledky. Odporúča sa použiť metódu ThOD, lebo niektoré látky sa v teste ChSK úplne neoxidujú.

37. Priebeh testu degradácie graficky znázornite v diagrame (pozri príklad v oddiele ‚Validita a interpretácia výsledkov'). Ak máte dostatok údajov, vypočítajte z biodegradačnej krivky lag fázu (t_L) a čas potrebný na dosiahnutie 50 % eliminácie od konca lag fázy (t_{50}).

38. Ak sa použije špecifická analýza (voliteľná), uveďte percento primárnej degradácie ako percento eliminácie špecifickej látky v rámci testovacieho obdobia (s korekciou vzhľadom analytické slepé vzorky).

Protokol o skúške

39. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje.

Podmienky testu:

— umiestnenie a opis miesta odberu vzoriek: stav znečistenia a živín (počet kolónií, dusičnany, amóniové ióny, fosforečnany, ak je to vhodné),

— charakteristiky vzorky [dátum odberu vzorky, hĺbka, vzhľad, teplota, slanosť, DOC (voliteľné), čas medzi odberom a použitím v teste],

— použitá metóda zretia morskej vody (ak sa použije),

— metóda použitá na predúpravu (filtrácia/sedimentácia) morskej vody,

— metóda použitá na stanovenie ChSK (ak sa vykonáva),

— metóda použitá na merania kyslíka,

— postup disperzie pre látky, ktoré sú slabo rozpustné za testovacích podmienok,

— metóda použitá na určenie počtu heterotrofov v morskej vode (metóda počítania na miske alebo alternatívny postup),

— metóda použitá na stanovenie DOC v morskej vode (voliteľné),

— metóda použitá na špecifickú analýzu (voliteľné),

— iné voliteľné metódy použité na stanovenie vlastností morskej vody (merania ATP atď.).

Výsledky:

— analytické údaje uvedené na karte údajov (priloženej v dodatku 5),

— priebeh testu degradácie graficky znázornený v diagrame zobrazujúcom lag fázu (t_L), sklon a čas (od konca lag fázy) na dosiahnutie 50 % konečnej spotreby kyslíka spôsobenej oxidáciou testovanej látky (t_{50}); lag fázu možno graficky odhadnúť podľa pripojeného obrázka alebo jednoducho uviesť ako čas potrebný na 10 % degradáciu,

— percentuálna degradácia odmeraná po 28 dňoch.

Rozbor výsledkov

Validita a interpretácia výsledkov

40. Spotreba kyslíka v slepej vzorke by nemala presiahnuť 30 % kyslíka v testovacej fľaši. Ak nie je možné splniť toto kritérium s použitím čerstvo odobratej morskej vody, morská voda sa pred použitím musí nechať vyzrieť (stabilizovať).

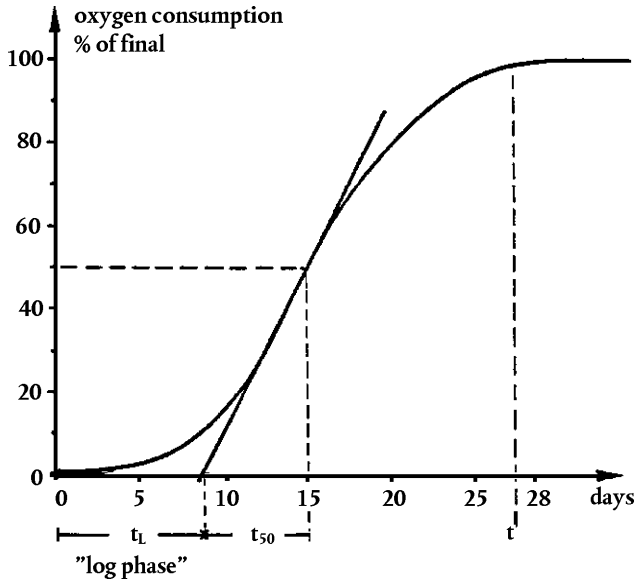
41. Treba zohľadniť možnosť, že výsledky môžu ovplyvniť látky obsahujúce dusík.

42. Výsledky získané použitím referenčných látok benzoanu sodného a anilínu by mali byť porovnateľné s výsledkami získanými v kruhovom teste (3) (bod 9). Ak sú výsledky získané s použitím referenčných látok atypické, test by sa mal zopakovať s použitím inej vzorky morskej vody.

43. Testovaná látka sa môže považovať za inhibujúcu pre baktérie (pri použitej koncentrácii), ak je hodnota BSK zmesi a referenčnej a testovanej látky nižšia než súčet hodnôt BSK pre samostatné roztoky týchto dvoch látok.

44. Vzhľadom na pomerne vysoké použité testované koncentrácie v porovnaní s väčšinou prírodných systémov (a teda nepriaznivý pomer medzi koncentráciami testovaných látok a iných zdrojov uhlíka) sa metóda má považovať za predbežnú skúšku, ktorú možno použiť na stanovenie, či látka je alebo nie je ľahko biodegradovateľná. V súlade s tým ani nízky výsledok nemusí nutne znamenať, že testovaná látka nie je biodegradovateľná v morskom prostredí, ale poukazuje na to, že na stanovenie tejto skutočnosti je potrebné vykonať ďalší výskum.

Na nasledujúcom obrázku je uvedený príklad teoretického pokusu s degradáciou, ktorý znázorňuje uskutočniteľný spôsob odhadu hodnôt t_L (dĺžka ‚lag fázy') a t_{50}, teda časového intervalu (začínajúceho pri t_L) potrebného na dosiahnutie 50 % konečnej spotreby kyslíka spôsobenej oxidáciou testovanej látky:



LITERATÚRA

1. de Kreuk J.F. a Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561 – 573.

2. Kapitola C.4 B tejto prílohy: Stanovenie ‚ľahkej' biodegradovateľnosti, časť III modifikovaný skríningový test OECD.

3. Nyholm N. a Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, marec 1987, Komisia Európskych spoločenstiev.

4. Kapitola C.11 tejto prílohy: Biodegradácia – respiračno-inhibičný test aktivovaného kalu.

5. Kapitola C.4 E tejto prílohy: Stanovenie ľahkej biodegradovateľnosti, časť VI test v uzavretej fľaši.

Dodatok 1

Stanovenie organického uhlíka v morskej vode

METÓDA TREPAČKOVEJ BANKY

Na stanovenie obsahu organického uhlíka vo vzorke vody sa organické zlúčeniny vo vzorke oxidujú na oxid uhličitý zvyčajne pomocou jednej z týchto troch metód:

— oxidáciou za mokra pomocou persíranu/UV ožarovania,

— oxidáciou za mokra pomocou persíranu/zvýšenej teploty (116 – 130 °C),

— spaľovaním.

Uvoľnený CO_2 sa kvantifikuje pomocou infračervenej spektrometrie alebo titrimetrie. Alternatívne sa CO_2 redukuje na metán, ktorý sa kvantifikuje na plameňovo-ionizačnom detektore (FID).

Metóda využívajúca persíran/UV ožarovanie sa bežne používa na analýzu ‚čistej' vody s nízkym obsahom tuhých častíc. Posledné dve metódy možno uplatniť na väčšinu druhov vzoriek vody, pričom metóda oxidácie pomocou persíranu/zvýšenej teploty je najvhodnejšia pre vzorky s nízkou koncentráciou a metódu spaľovania možno použiť na vzorky s obsahom neprchavého organického uhlíka (NVOC) výrazne vyšším ako 1 mg C/l.

Interferencie

Všetky tri metódy sú závislé od eliminácie alebo kompenzácie anorganického uhlíka (IC) prítomného vo vzorke. Odstránenie CO_2 z okyslenej vzorky je najčastejšie používanou metódou eliminácie IC, hoci to vedie aj k strate prchavých organických zlúčenín (1). V každej matrici vzorky sa musí zabezpečiť úplná eliminácia alebo kompenzácia IC a okrem hodnoty NVOC sa musí stanoviť aj obsah prchavého organického uhlíka (VOC) v závislosti od druhu vzorky.

Vysoké koncentrácie chloridu vedú k zníženiu oxidačnej účinnosti pomocou metódy persíranu/UV ožarovania (2). Túto interferenciu však možno odstrániť použitím oxidačného činidla upraveného pridaním dusičnanu ortutnatého. Odporúča sa, aby sa na vyhodnotenie každého druhu vzorky obsahujúcej chlorid použil maximálny prípustný objem vzorky. Vysoké koncentrácie solí vo vzorke analyzovanej metódou spaľovania môžu spôsobiť soľný povlak na katalyzátore a nadmernú koróziu spaľovacej trubice. Mali by sa prijať preventívne opatrenia podľa príručky výrobcu.

Veľmi zakalené vzorky, ako aj vzorky obsahujúce tuhé častice, sa pri použití metódy persíranu/UV ožarovania nemusia úplne oxidovať.

Príklad vhodnej metódy

Neprchavý organický uhlík sa stanoví metódou persíranu/UV ožarovania a následnou kvantifikáciou uvoľneného CO_2 pomocou nedisperznej infračervenej spektrometrie.

Oxidačné činidlo sa upraví v súlade s odporúčaniami uvedenými v literatúre (2) podľa príručky výrobcu:

a) 8,2 g $HgCl_2$ a 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ sa rozpustí v niekoľkých stovkách mililitrov reagenčnej vody s nízkou koncentráciou uhlíka;

b) 20 g $K_2S_2O_8$ sa rozpustí v soľnom roztoku ortuti;

c) do zmesi sa pridá 5 ml HNO_3 (konc.);

d) reaktant sa zriedi na 1 000 ml.

Interferencia chloridu sa odstráni pomocou objemu vzorky 40 µl pre 10 % chloridu a objemu vzorky 200 µl pre 1,9 % chloridu. Vzorky s vysokou koncentráciou chloridu a/alebo väčším objemom možno touto metódou analyzovať za predpokladu, že sa zabráni hromadeniu chloridu v oxidačnej nádobe. Následne sa podľa možnosti môže pre daný druh vzorky vykonať stanovenie prchavého organického uhlíka.

LITERATÚRA

1. ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16. január 1986.

2. American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Tiež relevantné (poskytuje opis systému autoanalýzy):

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.

Dodatok 2

Biodegradácia v morskej vode

METÓDA TREPAČKOVEJ BANKY

KARTA ÚDAJOV

1. **LABORATÓRIUM:**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU:**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA:**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: mg/l ako látka

Počiatočná koncentrácia v médiu, t_o: mg/l ako látka

: mg DOC/l

4. **MORSKÁ VODA:**

Zdroj:

Dátum odberu:

Hĺbka odberu:

Vzhľad v čase odberu (napr. zakalená atď.):

Slanosť pri odbere: ‰

Teplota pri odbere: °C

DOC ‚x' hodín po odbere: mg/l

Predúprava pred testovaním (napr. filtrácia, sedimentácia, zretie atď.):

Počet mikrobiálnych kolónií — pôvodná vzorka: kolónií/ml

— na začiatku testu: kolónií/ml

Ďalšie vlastnosti:

5. **STANOVENIE UHLÍKA:**

Analyzátor uhlíka:

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test: morská voda obohatená živinami s testovanou látkou	1	a_1					
		a_2					
		priemer, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		priemer, $C_{b(t)}$					
Slepá vzorka: morská voda obohatená živinami bez testovanej látky	1	c_1					
		c_2					
		priemer, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		priemer, $C_{d(t)}$					
	priemer, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOTENIE ZÁKLADNÝCH ÚDAJOV:**

Banka č.	Výpočet výsledkov	Degradácia v % po n dňoch				
		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				
Priemer (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Hodnoty D_1 a D_2 by sa nemali spriemerovať, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobné formáty možno použiť aj vtedy, keď po degradácii nasleduje špecifická analýza, a na kontrolu referenčnej látky a toxicity.

7. **ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA (voliteľné)**

	Čas (dni)	
	0	t
DOC konc. (mg/l) v sterilnej kontrole	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\ abiotickej\ degradácie = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

Dodatok 3

Výpočet teoretickej biochemickej spotreby kyslíka

METÓDA UZAVRETEJ FĽAŠE

Hodnota ThOD látky $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ s molekulovou hmotnosťou MW sa vypočíta podľa tohto vzorca:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o\right]}{MW}$$

Tento výpočet znamená, že C sa mineralizuje na CO_2, H na H_2O, P na P_2O_5 a Na na Na_2O. Halogén sa eliminuje ako halogénvodík a dusík ako amoniak.

Príklad:

Glukóza $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07\ mg\ O_2/mg\ \ glukózy$$

Molekulové hmotnosti iných solí ako solí alkalických kovov sa vypočítajú na základe predpokladu, že soli boli hydrolyzované.

Predpokladá sa, že síra sa oxiduje do stavu + 6.

Príklad:

n-dodecylbenzénsulfonát sodný $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34\ mg\ O_2/mg\ \ látky$$

V prípade látok s obsahom dusíka sa dusík môže eliminovať ako amoniak, dusitan alebo nitrát podľa rôznych teoretických biochemických spotrieb kyslíka.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o\right]}{MW}$$

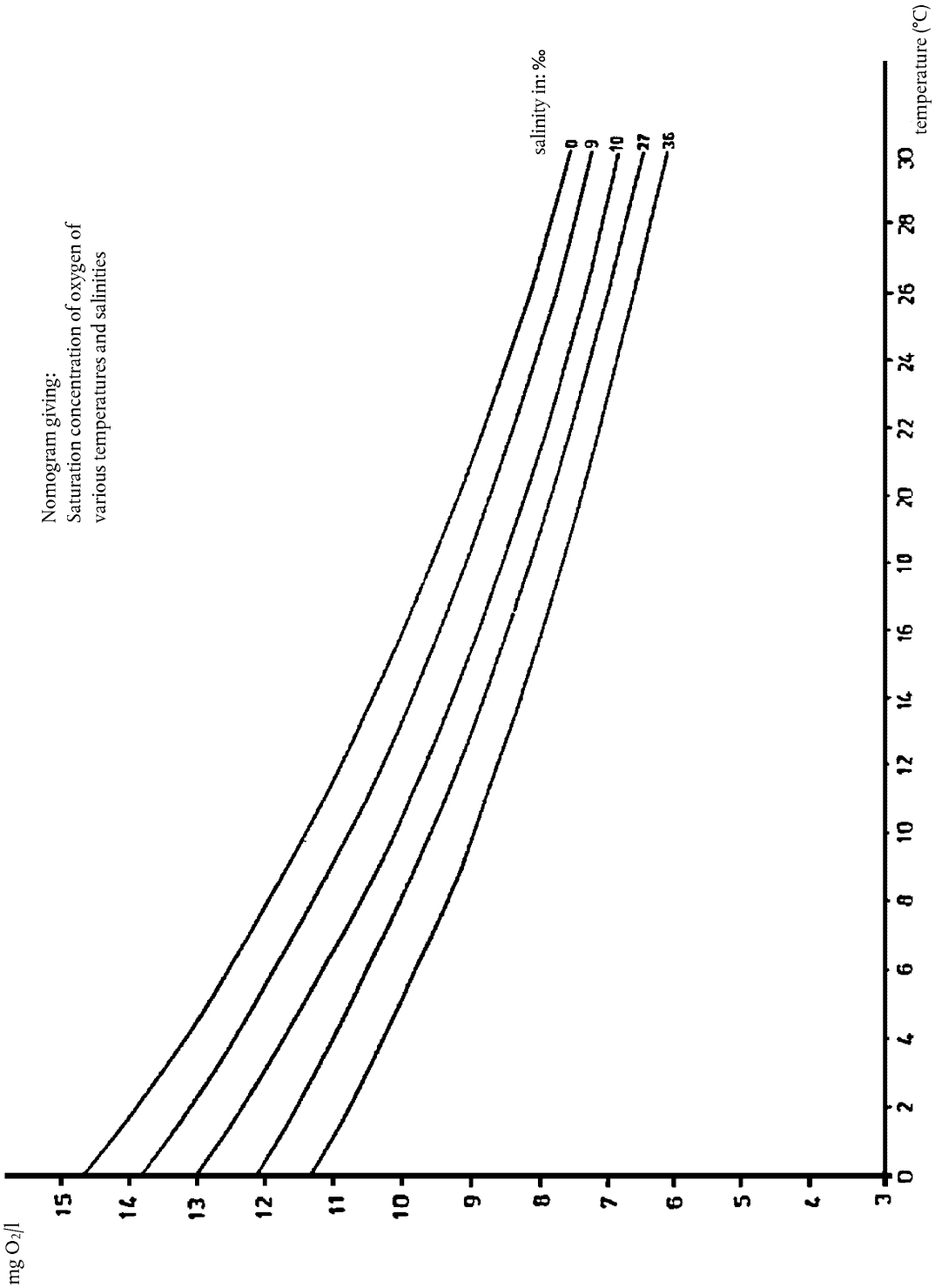
$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o\right]}{MW}$$

Predpokladajme, že v prípade sekundárneho amínu sa v analýze zistila úplná tvorba nitrátov:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44\ mg\ O_2/mg\ \ látky$$

Dodatok 4


Nomogram giving:
Saturation concentration of oxygen of various temperatures and salinities
salinity in: ‰
0
9
10
27
36
mg O2/l
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
temperature (°C)

Dodatok 5

Biodegradácia v morskej vode

METÓDA UZAVRETEJ FĽAŠE

KARTA ÚDAJOV

1. **LABORATÓRIUM:**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU:**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA:**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: mg/l
Počiatočná konc. v médiu morskej vody: mg/l
ThOD alebo ChSK: mg O_2/mg testovanej látky

4. **MORSKÁ VODA:**

Zdroj:

Dátum odberu:

Hĺbka odberu:

Vzhľad v čase odberu (napr. zakalená atď.):

Slanosť pri odbere: ‰
Teplota pri odbere: °C
DOC ‚x' hodín po odbere: mg/l

Predúprava pred testovaním (napr. filtrácia, sedimentácia, zretie atď.):

Počet mikrobiálnych kolónií — pôvodná vzorka: kolónií/ml
— na začiatku testu: kolónií/ml

Ďalšie vlastnosti:

5. **TESTOVACIE MÉDIUM:**

Teplota po prevzdušnení: °C
Koncentrácia O_2 po prevzdušnení a pred začiatkom testu: mg O_2/l

6. **STANOVENIE ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA:**

Metóda: Winklerova/elektródová

	Banka č.		mg O_2/l po n dňoch			
			0	5	15	28
Test: morská voda obohatená živinami s testovanou látkou	1	a_1				
	2	a_2				
	Priemer pre test	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Banka č.		mg O_2/l po n dňoch			
			0	5	15	28
Slepá vzorka: živina – obohatená morská voda, ale bez testovanej látky	1	c_1				
	2	c_2				
	Priemer pre slepú vzorku	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Poznámka: Podobný formát možno použiť na kontrolu referenčnej látky a toxicity.

7. **SPOTREBA ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA: % DEGRADÁCIE (% D):**

	Spotreba rozp. kyslíka po n dňoch		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)\ [1]}{\textit{testovaná látka}\ (mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] Tu sa predpokladá, že $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, kde
$m_{b(o)}$ = hodnota pre slepú vzorku v 0. deň,
$m_{t(o)}$ = hodnota pre testovanú látku v 0. deň.
Ak sa $m_{b(o)}$ nerovná $m_{t(o)}$, použite $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, kde
$m_{b(x)}$ = hodnota pre slepú vzorku v deň x,
$m_{t(x)}$ = hodnota pre testovanú látku v deň x.

C.43. ANAERÓBNA BIODEGRADOVATEĽNOSŤ ORGANICKÝCH LÁTOK VO VYHNITOM KALE: MERANÍM TVORBY PLYNU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 311 (2006). Existuje množstvo skríningových testov na hodnotenie aeróbnej biodegradovateľnosti organických látok [testovacie metódy C.4, C.9, C.10 a C.11 (1) a usmernenie OECD TG 302C (2)] a výsledky ich uplatňovania sa úspešne používajú na predpovedanie osudu látok v aeróbnom prostredí, najmä v aeróbnych fázach čistenia odpadových vôd. Aeróbne sa spracúvajú aj rôzne podiely látok nerozpustných vo vode a látok, ktoré sa adsorbujú na splaškové tuhé látky, lebo sú prítomné v usadených splaškových vodách. Väčšie frakcie týchto látok sú viazané na primárny usadený kal, ktorý sa oddeľuje od nespracovanej splaškovej vody v usadzovacích nádržiach pred tým, ako sa usadené alebo supernatantné splaškové vody čistia aeróbne. Kal, ktorý obsahuje niektoré z rozpustných látok v intersticiálnej tekutine, potom prechádza do zahrievaných vyhnívacích nádrží, kde dochádza k anaeróbnemu čisteniu. Doteraz v tejto sérii neexistovali testy na vyhodnotenie anaeróbnej biodegradovateľnosti v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach a tento test má túto medzeru vyplniť, nemusí však byť nevyhnutne použiteľný v iných zložkách životného prostredia bez kyslíka.

2. Na vyhodnotenie anaeróbnej biodegradovateľnosti sa používajú respirometrické metódy merania množstva vytvoreného plynu, najmä metánu (CH_4) a oxidu uhličitého (CO_2) za anaeróbnych podmienok. Birch a kol. (3) preskúmali tieto postupy a dospeli k záveru, že najkomplexnejšia bola práca Sheltona a Tiedjeho (4) vychádzajúca z predchádzajúcich štúdií (5) (6) (7). Táto metóda (4), ktorú ďalej rozvinuli ďalší autori (8) a stala sa základom pre americké normy (9) (10), nevyriešila problémy týkajúce sa rozdielnych rozpustností CO_2 a CH_4 v testovacom médiu a výpočtu teoretickej tvorby plynu z testovanej látky. V správe ECETOC (3) sa odporúča ďalšie meranie obsahu rozpusteného anorganického uhlíka (DIC) v kvapalnom supernatante, čím sa táto metóda stala širšie použiteľnou. Metóda ECETOC prešla medzinárodnou kalibráciou (alebo kruhovým testom) a stala sa normou ISO 11734 (11).

3. Táto testovacia metóda, ktorá je založená na norme ISO 11734 (11), opisuje skríningovú metódu na hodnotenie potenciálnej anaeróbnej biodegradovateľnosti organických látok za osobitných podmienok (t. j. v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach v danom čase a rozsahu koncentrácie mikroorganizmov). Keďže zriedený kal sa používa v pomerne vysokej koncentrácii testovanej látky a trvanie testu je zvyčajne dlhšie ako retenčný čas v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach, podmienky testu nemusia nevyhnutne zodpovedať podmienkam v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach ani nie sú použiteľné na hodnotenie anaeróbnej degradácie organických látok v iných podmienkach životného prostredia. Kal sa vystaví testovanej látke najviac na 60 dní, čo je dlhšie ako bežný retenčný čas kalu (25 – 30 dní) v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach, hoci v priemyselných čistiarňach môžu byť retenčné časy oveľa dlhšie. Predpovede podľa výsledkov tohto testu nie sú také presvedčivé ako v prípade aeróbnej biodegradácie. Získané dôkazy o správaní testovaných látok v ‚ľahkých' aeróbnych testoch a simulačných testoch a v aeróbnom prostredí sú totiž dostatočné na to, aby bolo možné presvedčivo tvrdiť, že medzi týmto správaním existuje spojenie. Len málo podobných dôkazov existuje v prípade anaeróbneho prostredia. Úplnú anaeróbnu degradáciu možno predpokladať vtedy, keď sa dosiahne 75 – 80 % teoretickej tvorby plynu. Vysoké podiely látky k biomase použité v týchto testoch znamenajú, že látka, ktorá prejde testom, sa s väčšou pravdepodobnosťou degraduje v anaeróbnej vyhnívacej nádrži. Ďalej platí, že látky, ktoré sa v teste nepremenia na plyn, sa nemusia nevyhnutne zachovať v realistickejšom životnom prostredí, pokiaľ ide o pomer látky a biomasy. Prebiehajú aj ďalšie anaeróbne reakcie, ktorými sa látky môžu aspoň čiastočne degradovať, napr. dechlorácia, ale v tomto teste sa tieto reakcie neodhalia. Uplatnením špecifických analytických metód na stanovenie testovanej látky však možno monitorovať jej elimináciu (pozri body 6, 30, 44 a 53).

PRINCÍP TESTU

4. Premytý spracovaný kal ([1]) s nízkou (< 10 mg/l) koncentráciou anorganického uhlíka (IC) sa zriedi približne desaťnásobne tak, aby sa dosiahla celková koncentrácia tuhých látok 1 – 3 g/l, a inkubuje sa pri teplote

([1]) Spracovaný kal je zmesou usadených fáz splaškovej vody a aktivovaného kalu, ktoré sa inkubovali v anaeróbnej vyhnívacej nádrži pri teplote približne 35 °C s cieľom znížiť biomasu a zápach a zlepšiť odvodňovaciu schopnosť kalu. Skladá sa zo spojenia anaeróbnych fermentačných a metanogénnych baktérií vytvárajúcich oxid uhličitý a metán (11).

35 °C ± 2 °C v utesnených nádobách s testovanou látkou v koncentrácii 20 – 100 mg C/l maximálne 60 dní. Umožní sa meranie aktivity kalu, a to tak, že sa súbežne analyzujú slepé kontrolné vzorky s kalovým inokulom v médiu, ale bez testovanej látky.

5. Odmeria sa zvýšenie tlaku v uzavretom priestore nad kvapalinou v nádobách v dôsledku tvorby oxidu uhličitého a metánu. Veľká časť vytvoreného CO_2 sa za podmienok testu rozpustí v kvapalnej fáze alebo transformuje na uhličitan alebo hydrogénuhličitan. Tento anorganický uhlík sa odmeria na konci testu.

6. Množstvo uhlíka (anorganického a metánu), ktoré vzniklo biodegradáciou testovanej látky, sa vypočíta z čistej tvorby plynu a čistej tvorby IC v kvapalnej fáze navyše oproti hodnotám v slepej kontrolnej vzorke. Rozsah biodegradácie sa vypočíta z celkového vytvoreného IC a uhlíka v metáne ako percento z nameraného alebo vypočítaného množstva uhlíka pridaného ako testovaná látka. V priebehu biodegradácie sa môžu vykonávať iba priebežné merania tvorby plynu. Špecifickými analýzami možno navyše stanoviť primárnu biodegradáciu na začiatku a na konci testu.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

7. Na správnu interpretáciu výsledkov je potrebné poznať čistotu, rozpustnosť vo vode, prchavosť a adsorpčné vlastnosti testovanej látky. Je potrebné poznať obsah organického uhlíka (hmotnostné percento) v testovanej látke buď podľa jej chemickej štruktúry, alebo na základe merania. V prípade prchavých testovaných látok je pri rozhodovaní o vhodnosti testu užitočná nameraná alebo vypočítaná Henryho konštanta. Pri výbere vhodnej testovanej koncentrácie a pri interpretácii výsledkov poukazujúcich na slabú biodegradovateľnosť sú užitočné informácie o toxicite testovanej látky pre anaeróbne baktérie. Pokiaľ nie je známe, že testovaná látka nemá na anaeróbnu mikrobiálnu činnosť inhibičné účinky, odporúča sa zahrnúť kontrolu inhibície [pozri bod 21 a normu ISO 13641-1 (12)].

UPLATNITEĽNOSŤ TESTOVACEJ METÓDY

8. Testovaciu metódu možno použiť na látky rozpustné vo vode. Možno ju použiť aj na slabo rozpustné a nerozpustné látky za predpokladu, že sa použije metóda presného dávkovania [pozri napr. normu ISO 10634 (13)]. V prípade prchavých látok je vo všeobecnosti nutné rozhodovať sa v každom jednotlivom prípade osobitne. Môže byť potrebné prijať osobitné opatrenia, napríklad neuvoľňovať počas testu plyn.

REFERENČNÉ LÁTKY

9. Na účely kontroly postupu sa súbežne so štandardným testovaním testuje aj referenčná látka s použitím vhodných nádob. Príkladmi sú fenol, benzoan sodný a polyetylénglykol 400, pri ktorých sa očakáva degradácia viac než 60 % teoretickej tvorby plynu (t. j. metánu a anorganického uhlíka) do 60 dní (3) (14).

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV TESTU

10. V medzinárodnom kruhovom teste (14) sa dosiahla dobrá reprodukovateľnosť merania tlaku plynu medzi troma replikátmi nádob. Relatívna štandardná odchýlka (variačný koeficient, COV) bola väčšinou nižšia ako 20 %, hoci táto hodnota sa často zvýšila na > 20 % v prítomnosti toxických látok alebo ku koncu 60-dňového inkubačného obdobia. Väčšie odchýlky sa zistili aj v nádobách s objemom < 150 ml. Konečné hodnoty pH testovacieho média boli v rozmedzí 6,5 – 7,0.

11. V kruhovom teste sa získali tieto výsledky:

Testovaná látka	Celkové údaje n_1	Priemerná degradácia (z celkových údajov) (%)	Relatívna štandardná odchýlka (z celkových údajov) (%)	Platné údaje n2	Priemerná degradácia (z platných údajov) (%)	Relatívna štandardná odchýlka (z platných údajov) (%)	Údaje > 60 % degradácia v platných testoch n_3
Kyselina palmitová	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polyetylénglykol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Podiel n_2

12. Variačné koeficienty pre priemery všetkých hodnôt získaných s kyselinou palmitovou a polyetylénglykolom 400 boli až 45 % (n = 36), resp. 35 % (n = 38). Keď sa vylúčili hodnoty < 40 % a > 100 % (v prvom prípade sa predpokladá, že sú dôsledkom suboptimálnych podmienok, v druhom sú dôvody neznáme), hodnoty COV sa znížili na 26 %, resp. 23 %. Podiel ‚platných' hodnôt znamenajúcich aspoň 60 % degradáciu bol 70 % v prípade kyseliny palmitovej a 83 % v prípade polyetylénglykolu 400. Podiel percentuálnej biodegradácie odvodenej z meraní DIC bol pomerne nízky, ale variabilný. V prípade kyseliny palmitovej bol rozsah 0 – 35 %, priemer 12 % a hodnota COV 92 %, v prípade polyetylénglykolu 400 bol rozsah 0 – 40 %, priemer 24 % a hodnota COV 54 %.

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Prístroje

13. Potrebné je bežné laboratórne vybavenie a toto:

a) inkubátor – odolný proti elektrickému výboju a regulovaný na teplotu 35 °C ± 2 °C,

b) sklenené testovacie nádoby odolné proti tlaku vhodnej nominálnej veľkosti ([1]), každá s plynotesnou priehradkou schopnou vydržať tlak približne 2 bary. Objem uzavretého priestoru nad kvapalinou by mal byť aspoň 10 – 30 % celkového objemu. Ak sa bioplyn uvoľňuje pravidelne, vhodný objem uzavretého priestoru nad kvapalinou je približne 10 %, ale ak sa plyn uvoľňuje len na konci testu, vhodný objem je 30 %. Keď sa tlak uvoľňuje v každom čase odberu vzoriek, odporúča sa použiť sklenené sérové fľaše s nominálnym objemom 125 ml, celkovým objemom približne 160 ml, utesnené sérovou priehradkou ([2]) a zahnutými hliníkovými krúžkami.

c) zariadenie na meranie tlaku ([3]) prispôsobené tak, aby umožňovalo meranie a odvetrávanie vzniknutého plynu, napríklad ručný presný tlakomer pripojený k vhodnej injekčnej ihle. Trojcestný plynotesný ventil uľahčuje uvoľňovanie nadmerného tlaku (dodatok 1). Je nutné použiť hadičky a ventil snímača tlaku s čo najnižším vnútorným objemom, aby boli chyby vzniknuté zanedbaním objemu zariadenia zanedbateľné,

([1]) Odporúčaná veľkosť je 0,1 litra až 1 liter.
([2]) Odporúča sa použiť plynotesnú silikónovú priehradku. Ďalej sa odporúča, aby sa otestovala plynotesnosť uzáverov, najmä priehradiek z butylového kaučuku, lebo viaceré komerčne dostupné priehradky nie sú dostatočne plynotesné proti metánu a niektoré priehradky nezostanú tesné, keď sa v podmienkach testu prepichnú ihlou.
([3]) Zariadenie by sa malo používať a kalibrovať v pravidelných intervaloch podľa pokynov výrobcu. Ak sa použije tlakomer predpísanej kvality, napr. obalený oceľovou membránou, kalibrácia v laboratóriu nie je potrebná. Presnosť kalibrácie je možné skontrolovať v laboratóriu pomocou jednobodového merania pri tlaku 1×10^5 Pa porovnaním s tlakomerom s mechanickým displejom. Ak sa tento bod odmeria správne, nezmení sa ani lineárnosť. Ak sa použijú iné meracie prístroje (bez kalibrácie osvedčenej výrobcom), odporúča sa kalibrácia v celom rozsahu v pravidelných intervaloch.

Poznámka – Hodnoty tlaku sa používajú priamo na výpočet množstva uhlíka vytvoreného v uzavretom priestore nad kvapalinou (body 42 až 44). Alternatívne možno hodnoty tlaku pomocou prevodového grafu previesť na objemy (pri teplote 35 °C a atmosférickom tlaku) vytvoreného plynu. Tento graf sa vytvorí z údajov získaných vstreknutím známych objemov plynného dusíka do série testovacích nádob (napr. sérových fliaš) pri teplote 35 ± 2 °, pričom sa zaznamenajú hodnoty vzniknutého stabilizovaného tlaku (pozri dodatok 2). Výpočet je uvedený v poznámke v bode 44.

Varovanie – dbajte na to, aby pri používaní mikrostriekačiek nedošlo k poraneniu ihlou.

d) analyzátor uhlíka vhodný na priame stanovenie anorganického uhlíka v rozsahu od 1 mg/l do 200 mg/l,

e) striekačky s vysokou presnosťou na plynné a kvapalné vzorky,

f) magnetické miešadlá a miešadielka (voliteľné),

g) rukavicový box (odporúčané).

Reaktanty

14. Vždy sa používajú analyticky čisté reaktanty.

Voda

15. Destilovaná alebo deionizovaná voda (odkysličená čerením plynným dusíkom obsahujúcim menej než 5 µl/l kyslíka), ktorá obsahuje menej než 2 mg/l rozpusteného organického uhlíka (DOC).

Testovacie médium

16. Pripravte riediace médium tak, aby obsahovalo tieto zložky v uvedenom množstve:

Bezvodý dihydrogénfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	0,27 g
Dodekahydrát hydrogénfosforečnanu disodného ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Chlorid amónny (NH_4Cl)	0,53 g
Dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Hexahydrát chloridu horečnatého ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Tetrahydrát chloridu železnatého ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurín (indikátor kyslíka)	0,001 g
Nonahydrát sulfidu sodného ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Zásobný roztok stopových prvkov (voliteľné, bod 18)	10 ml
Pridajte odkysličenú vodu (bod 15)	do 1 litra

Poznámka: Mal by sa použiť čerstvý sulfid sodný alebo by sa pred použitím mal premyť a vysušiť, aby mal dostatočnú redukčnú kapacitu. Test možno vykonať bez použitia rukavicového boxu (pozri bod 26). V takom prípade by sa konečná koncentrácia sulfidu sodného v médiu mala zvýšiť na 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ na liter. Sulfid sodný sa môže pridať aj z vhodného anaeróbneho zásobného roztoku cez priehradku uzavretých testovacích nádob, lebo týmto postupom sa zníži riziko oxidácie. Sulfid sodný sa môže nahradiť citranom titanitým, ktorý sa pridáva cez priehradku uzavretých testovacích nádob v konečnej koncentrácii 0,8 – 1,0 mmol/l. Citran titanitý je vysoko účinné redukčné činidlo s nízkou toxicitou, ktoré sa pripravuje takto: Rozpustite 2,94 g

dihydrátu citranu sodného v 50 ml odkysličenej vody (aby sa získal roztok 200 mmol/l) a pridajte 5 ml 15 % (hmotnosť/objem) roztoku chloridu titanitého. Neutralizujte anorganickými zásadami na pH 7 ± 0,2 a pridajte do vhodnej nádoby pod prúdom dusíka. Koncentrácia citranu titanitého v tomto zásobnom roztoku je 164 mmol/l.

17. Zmiešajte zložky testovacieho média s výnimkou redukčného činidla (sulfid sodný alebo citran titanitý) a bezprostredne pred použitím čerte roztok plynným dusíkom asi 20 minút, aby sa odstránil kyslík. Potom bezprostredne pred použitím média pridajte vhodný objem čerstvo pripraveného roztoku redukčného činidla (pripraveného v odkysličenej vode). Podľa potreby upravte pH média zriedenou anorganickou kyselinou alebo zásadou na 7 ± 0,2.

Zásobný roztok stopových prvkov (voliteľné)

18. Odporúča sa, aby testovacie médium obsahovalo tieto stopové prvky na zlepšenie procesov anaeróbnej degradácie, najmä ak sa používajú nízke koncentrácie (napr. 1 g/l) inokula (11).

Tetrahydrát chloridu manganatého ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Kyselina boritá (H_3BO_3)	5 mg
Chlorid zinočnatý ($ZnCl_2$)	5 mg
Chlorid meďnatý ($CuCl_2$)	3 mg
Dihydrát molybdénanu disodného ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Hexahydrát chloridu kobaltnatého ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Hexahydrát chloridu nikeltnatého ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Seleničitan disodný (Na_2SeO_3)	5 mg
Pridajte odkysličenú vodu (bod 15)	do 1 litra

Testovaná látka

19. Pridajte testovanú látku ako zásobný roztok, suspenziu, emulziu alebo priamo ako tuhú alebo kvapalnú látku, alebo absorbovanú na filter zo sklených vlákien, aby sa dosiahla koncentrácia maximálne 100 mg/l organického uhlíka. Ak sa používajú zásobné roztoky, pripravte vhodný roztok vo vode (bod 15) (predtým odkysličenej čerením plynným dusíkom) takej sily, aby bol pridaný objem nižší ako 5 % celkového objemu reakčnej zmesi. Podľa potreby upravte pH zásobného roztoku na 7 ± 0,2. V prípade testovaných látok, ktoré sú nedostatočne rozpustné vo vode, si prečítajte normu ISO 10634 (13). Ak sa použije rozpúšťadlo, pripravte ďalšiu kontrolnú vzorku, v ktorej sa do inokulovaného média pridá len rozpúšťadlo. Nemali by sa používať organické rozpúšťadlá, o ktorých sa vie, že inhibujú tvorbu metánu, ako je chloroform a tetrachlórmetán.

Varovanie – s toxickými testovanými látkami a testovanými látkami, ktorých vlastnosti nie sú známe, zaobchádzajte opatrne.

Referenčné látky

20. Na kontrolu postupu sa úspešne používajú referenčné látky ako benzoan sodný, fenol a polyetylénglykol 400, ktoré sa v priebehu 60 dní biodegradujú na viac ako 60 %. Pripravte zásobný roztok (v odkysličenej vode) zvolenej referenčnej látky rovnakým spôsobom ako v prípade testovanej látky a podľa potreby upravte pH na 7 ± 0,2.

Kontrola inhibície (podmienené)

21. Na účely získania informácií o toxicite testovanej látky pre anaeróbne mikroorganizmy s cieľom nájsť najvhodnejšiu testovanú koncentráciu pridajte do nádoby obsahujúcej testovacie médium (pozri bod 16) testovanú látku a referenčnú látku v rovnakej koncentrácii, v akej sa pridáva v rámci samotného testu [pozri body 19 a 20 a normu ISO 13641-1 (12)].

Spracovaný kal

22. Odoberte spracovaný kal z vyhnívacej nádrže v čistiarni odpadových vôd, ktorá spracúva prevažne odpadové vody z domácností. Kal by sa mal úplne charakterizovať a do správy by sa mali uviesť základné informácie o ňom (pozri bod 54). Ak sa zamýšľa použiť upravené inokulum, možno uvažovať o použití spracovaného kalu z čistiarne priemyselných splaškových vôd. Na odber spracovaného kalu použite fľaše so širokým hrdlom vyrobené z polyetylénu s vysokou hustotou alebo z podobného materiálu, ktorý sa môže rozširovať. Kal naplňte približne do 1 cm od horného okraja fliaš a hermeticky uzavrite, najlepšie bezpečnostným ventilom. Po preprave do laboratória možno odobratý kal priamo použiť alebo umiestniť do laboratórnej vyhnívacej nádrže. Nadmerné množstvo bioplynu uvoľnite opatrným otvorením fliaš s kalom. Prípadne možno ako zdroj inokula použiť anaeróbny kal vytvorený v laboratóriu, ale jeho spektrum aktivity môže byť narušené.

Varovanie – spracovaný kal vytvára horľavé plyny, ktoré predstavujú riziko vzniku požiaru a výbuchu. Obsahuje aj potenciálne patogénne organizmy, takže pri manipulácii s ním prijmite vhodné preventívne opatrenia. Z bezpečnostných dôvodov nepoužívajte na odber kalu sklenené nádoby.

23. Možno uvažovať o predspracovaní kalu, aby sa znížila tvorba plynu v pozadí a obmedzil vplyv slepých kontrolných vzoriek. Ak sa vyžaduje predspracovanie, kal by sa mal nechať vyhnívať bez pridania živín alebo substrátov pri teplote 35 °C ± 2 °C maximálne sedem dní. Zistilo sa, že predspracovanie počas približne piatich dní zvyčajne vedie k optimálnemu poklesu tvorby plynu v slepej vzorke bez neprijateľného predĺženia lag fázy alebo inkubačného obdobia počas testovacej fázy alebo bez straty pôsobenia v prípade malého počtu testovaných látok.

24. V prípade testovaných látok, ktoré sú alebo by mohli byť slabo biodegradovateľné, zvážte predexpozíciu kalu testovanej látke, aby sa získalo lepšie prispôsobené inokulum. V takom prípade pridajte testovanú látku s koncentráciou organického uhlíka 5 – 20 mg/l do spracovaného kalu a inkubujte až dva týždne. Pred použitím predexponovaný kal opatrne premyte (pozri bod 25) a do protokolu o skúške uveďte podmienky predexpozície.

Inokulum

25. Bezprostredne pred použitím premyte kal (pozri body 22 až 24), aby sa koncentrácia IC v konečnej testovacej suspenzii znížila na menej ako 10 mg/l. Odstreďte kal v utesnených skúmavkách (napr. 3 000 g počas 5 minút) a odoberte supernatant. Suspendujte výslednú peletu v odkysličenom médiu (body 16 a 17), suspenziu znova odstreďte a odoberte supernatant. Ak sa hodnota IC dostatočne neznížila, postup premývania kalu možno zopakovať maximálne dvakrát. Zdá sa, že to nemá nepriaznivý vplyv na mikroorganizmy. Napokon peletu suspendujte v požadovanom objeme testovacieho média a stanovte celkovú koncentráciu tuhých látok [napr. ISO 11923 (15)]. Konečná celková koncentrácia tuhých látok v testovacích nádobách musí byť v rozsahu od 1 g/l do 3 g/l (alebo približne 10 % koncentrácie v nezriedenom spracovanom kale). Uvedené činnosti vykonajte tak, aby sa kal dostal do minimálneho kontaktu s kyslíkom (napr. s použitím dusíkatej atmosféry).

POSTUP TESTOVANIA

26. Vykonajte nasledujúce úvodné postupy s využitím metód na udržanie čo najmenšieho možného kontaktu medzi spracovaným kalom a kyslíkom. Napríklad môže byť potrebné pracovať v rukavicovom boxe v dusíkatej atmosfére a/alebo prefúknuť fľaše dusíkom (4).

Príprava testovacích a kontrolných skúšok

27. Pripravte aspoň tri replikáty testovacích nádob [pozri bod 13 písm. b)] pre komory s testovanou látkou, slepými kontrolnými vzorkami, referenčnou látkou, kontrolou inhibície (podmienené) a kontrolou tlaku (voliteľný postup) (pozri body 7, 19 až 21). Možno pripraviť aj ďalšie nádoby na účely hodnotenia primárnej biodegradácie pomocou špecifických analýz testovanej látky. Rovnaký súbor slepých kontrolných vzoriek možno použiť pre viaceré testované látky v tom istom teste, pokiaľ je objem uzavretého priestoru nad kvapalinou rovnaký.

28. Pripravte zriedené inokulum a pridajte ho do nádob, napr. pomocou pipety so širokým otvorom. Alikvotné časti dobre premiešaného inokula (bod 25) pridávajte tak, aby koncentrácia tuhých látok bola vo všetkých nádobách rovnaká (medzi 1 g/l a 3 g/l). Pridajte zásobné roztoky testovanej a referenčnej látky, pričom podľa potreby najskôr upravte pH na 7 ± 0,2. Testovaná látka a referenčná látka by sa mali pridať s použitím najvhodnejšieho spôsobu pridania (bod 19).

29. Testovaná koncentrácia organického uhlíka by zvyčajne mala byť medzi 20 a 100 mg/l (bod 4). Ak je testovaná látka toxická, testovaná koncentrácia by sa mala znížiť na 20 mg C/l alebo aj menej, ak sa má merať len primárna biodegradácia pomocou špecifických analýz. Treba poznamenať, že variabilita výsledkov testu sa zvyšuje pri nižších testovaných koncentráciách.

30. V prípade slepých nádob pridajte namiesto zásobného roztoku, suspenzie alebo emulzie rovnocenné množstvo nosiča použitého na dávkovanie testovanej látky. Ak sa testovaná látka aplikovala pomocou filtrov zo sklených vlákien alebo organických rozpúšťadiel, pridajte do slepých nádob filter alebo rovnocenný objem odpareného rozpúšťadla. Pripravte navyše jeden replikát s testovanou látkou na odmeranie hodnoty pH. Podľa potreby upravte pH na 7 ± 0,2 pomocou malého množstva zriedenej anorganickej kyseliny alebo zásady. Do všetkých testovacích nádob sa má pridať rovnaké množstvo neutralizačného činidla. Nemalo by to však byť potrebné, lebo hodnota pH zásobných roztokov testovanej látky a referenčnej látky už bola upravená (pozri body 19 a 20). Ak sa má merať primárna biodegradácia, má sa odobrať vhodná vzorka z nádoby na kontrolu pH alebo z ďalšej testovacej nádoby a pomocou špecifických analýz sa má odmerať koncentrácia testovanej látky. Ak je potrebné reakčné zmesi premiešať, do všetkých nádob možno pridať zakryté magnety (voliteľné).

31. Zabezpečte, aby boli celkový objem kvapaliny V_l a objem uzavretého priestoru nad kvapalinou V_h vo všetkých nádobách rovnaké. Hodnoty V_l a V_h si poznačte a uveďte do správy. Každá nádoba sa má utesniť plynotesnou priehradkou a preniesť z rukavicového boxu (pozri bod 26) do inkubátora [pozri bod 13 písm. a)].

Nerozpustné testované látky

32. Priamo do pripravených nádob pridajte odvážené množstvá látok slabo rozpustných vo vode. Ak je potrebné použiť rozpúšťadlo (pozri bod 19), preneste roztok alebo suspenziu testovanej látky do prázdnych nádob. Ak je to možné, rozpúšťadlo nechajte odpariť zavedením plynného dusíka do nádob a potom pridajte ostatné zložky, teda zriedený kal (bod 25) a podľa potreby odkysličenú vodu. Je potrebné pripraviť aj doplnkovú kontrolnú vzorku s rozpúšťadlom (pozri bod 19). Ďalšie metódy pridávania nerozpustných látok nájdete v norme ISO 10634 (13). Kvapalné testované látky sa môžu pridávať striekačkou do úplne pripravených utesnených nádob, ak možno očakávať, že počiatočná hodnota pH nepresiahne 7 ± 1. V opačnom prípade použite postup opísaný vyššie (pozri bod 19).

Inkubácia a meranie tlaku plynu

33. Inkubujte pripravené nádoby pri teplote 35 °C ± 2 °C počas približne 1 hodiny, aby sa dosiahol rovnovážny stav, a uvoľnite nadmerný plyn do atmosféry napríklad pretrepaním každej nádoby tak, že ihla tlakomera (bod 13) sa zavedie cez tesnenie a ventil sa otvorí, kým tlakomer neukáže nulu. Ak je v tejto fáze alebo pri uskutočňovaní priebežných meraní tlak v uzavretom priestore nad kvapalinou nižší ako atmosférický tlak, je potrebné zaviesť plynný dusík, aby sa atmosférický tlak obnovil. Zatvorte ventil [pozri bod 13 písm. c)] a pokračujte v inkubácii v tme, pričom zabezpečte, aby sa všetky časti nádob udržiavali pri teplote vyhnívania. Po inkubácii pozorujte nádoby počas 24 – 48 hodín. Nádoby vyraďte, ak má obsah nádob zreteľné ružové zafarbenie v supernatante, t. j., ak sa zmenila farba resazurínu (pozri bod 16), čo poukazuje na prítomnosť kyslíka (pozri bod 50). Hoci malé množstvo kyslíka je systém schopný tolerovať, vyššie koncentrácie môžu výrazne inhibovať priebeh anaeróbnej degradácie. Občasné vyradenie jednej nádoby zo súboru troch replikátov je prijateľné, ale v prípade výskytu viacerých takých prípadov je nutné preskúmať experimentálne postupy a zopakovať test.

34. Opatrne premiešajte obsah každej nádoby miešaním alebo trasením počas niekoľkých minút aspoň dva- alebo trikrát za týždeň a krátko pred jednotlivými meraniami tlaku. Trasením sa inokulum resuspenduje a dosiahne sa rovnováha plynov. Všetky merania tlaku by sa mali vykonať rýchlo, lebo v testovacích nádobách môže dôjsť k zníženiu teploty, čo vedie k nesprávnym údajom. Počas merania tlaku sa má celá testovacia nádoba vrátane uzavretého priestoru nad kvapalinou udržiavať pri teplote vyhnívania. Tlak plynu odmerajte napríklad zavedením injekčnej ihly pripojenej k tlakomeru cez priehradku [bod 13 písm. c)]. Treba dávať pozor, aby sa do injekčnej ihly nedostala voda. Ak sa to stane, mokré časti sa musia vysušiť a musí sa nasadiť nová ihla. Tlak sa meria v milibaroch (pozri bod 42). Tlak plynu v nádobách sa môže merať pravidelne, napr. raz týždenne, a prebytok plynu sa môže uvoľniť do okolia. Alternatívne sa tlak meria len na konci testu na stanovenie množstva vytvoreného bioplynu.

35. Odporúča sa vykonávať priebežné merania tlaku plynu, lebo zvýšenie tlaku poskytuje usmernenie o tom, kedy možno test ukončiť, a umožňuje sledovať kinetiku (pozri bod 6).

36. Zvyčajne sa test ukončí po uplynutí inkubačného obdobia 60 dní, pokiaľ biodegradačná krivka získaná z meraní tlaku nedosiahla ešte predtým plató, teda stav, v ktorom sa dosiahla maximálna degradácia a biodegradačná krivka sa vyrovnala. Ak je hodnota plató nižšia ako 60 %, interpretácia je problematická, lebo to naznačuje, že sa mineralizovala iba časť molekuly alebo že došlo k chybe. Ak sa na konci zvyčajného inkubačného obdobia tvorí plyn, ale zjavne sa ešte nedosiahla fáza plató, treba zvážiť predĺženie testu na overenie, či sa dosiahne plató (> 60 %).

Meranie anorganického uhlíka

37. Na konci testu po poslednom meraní tlaku plynu nechajte kal usadiť. Postupne otvorte všetky nádoby a ihneď odoberte vzorku na stanovenie koncentrácie (mg/l) anorganického uhlíka (IC) v supernatante. Supernatant sa nemá odstreďovať ani filtrovať, lebo by došlo k neprijateľnej strate rozpusteného oxidu uhličitého. Ak supernantant nemožno analyzovať ihneď po odbere, na maximálne dva dni ho uskladnite v utesnenej fľaštičke bez priestoru nad kvapalinou v chlade pri teplote 4 °C. Po odmeraní hodnoty IC odmerajte a zaznamenajte hodnotu pH.

38. Alternatívne možno hodnotu IC v supernatante stanoviť nepriamo prostredníctvom uvoľnenia rozpusteného IC ako oxidu uhličitého, ktorý možno odmerať v uzavretom priestore nad kvapalinou. Po poslednom meraní tlaku plynu upravte tlak v každej testovacej nádobe na atmosférický tlak. Okyslite obsah každej nádoby približne na pH 1 pridaním koncentrovanej anorganickej kyseliny (napr. H_2SO_4) cez priehradku utesnených nádob. Za pretrepávania inkubujte nádoby pri teplote 35 °C ± 2 °C počas približne 24 hodín a tlakomerom odmerajte tlak plynu v dôsledku vzniknutého oxidu uhličitého.

39. Podobné údaje získajte aj pre príslušné nádoby so slepou vzorkou, referenčnou látkou a kontrolou inhibície, ak sa použila (pozri bod 21).

40. V niektorých prípadoch, najmä ak sa pre viaceré testované látky použijú rovnaké kontrolné nádoby, treba podľa potreby zvážiť merania priebežných koncentrácií IC v testovacích a kontrolných nádobách. V takom prípade sa má pripraviť dostatočný počet nádob na všetky priebežné merania. Tento postup sa uprednostňuje pred odobratím všetkých vzoriek iba z jednej nádoby. To možno urobiť len vtedy, keď sa požadovaný objem na analýzu DIC nepovažuje za príliš vysoký. Meranie DIC by sa malo uskutočniť po meraní tlaku plynu bez uvoľnenia prebytočného plynu podľa opisu ďalej:

— striekačkou odoberte čo najmenší objem vzoriek supernatantu cez priehradku bez otvorenia nádob a stanovte hodnotu IC vzorky,

— po odobratí vzorky sa prebytok plynu uvoľní alebo neuvoľní,

— treba vziať do úvahy, že aj malé zníženie objemu supernatantu (napr. o 1 %) môže spôsobiť značné zvýšenie objemu plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou (V_h),

— rovnice (pozri bod 44) sa podľa potreby upravia zvýšením hodnoty V_h v rovnici 3.

Špecifické analýzy

41. Ak sa má stanoviť primárna anaeróbna degradácia (pozri bod 30), na začiatku a na konci testu odoberte z nádob obsahujúcich testovanú látku vhodný objem vzorky na špecifické analýzy. V takom prípade majte na zreteli, že objem uzavretého priestoru nad kvapalinou (V_h) a objem kvapaliny (V_l) sa zmenia a zohľadnite to pri výpočte výslednej tvorby plynu. Alternatívne možno vzorky na špecifické analýzy odobrať z ďalších zmesí vopred pripravených na tento účel (bod 30).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

42. Z praktických dôvodov sa tlak plynu meria v milibaroch (1 mbar = 1 h Pa = 10^2 Pa, 1 Pa = 1 N/m^2), objem v litroch a teplota v stupňoch Celzia.

Uhlík v uzavretom priestore nad kvapalinou

43. Keďže 1 mol metánu i 1 mol oxidu uhličitého obsahujú 12 g uhlíka, hmotnosť uhlíka v danom objeme uvoľneného plynu sa môže vyjadriť ako:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{Rovnica [1]}$$

kde:

m = hmotnosť uhlíka (mg) v danom objeme uvoľneného plynu,

12 = relatívna atómová hmotnosť uhlíka,

n = počet molov plynu v danom objeme.

Ak sa v značných množstvách tvorí iný plyn ako metán alebo oxid uhličitý (napr. N_2O), vzorec [1] by sa mal upraviť tak, aby opisoval možnosť účinkov vytvorených plynov.

44. Podľa zákonov o plynoch možno n vyjadriť ako:

$$n = \frac{pV}{RT} \qquad \text{Rovnica [2]}$$

kde:

p = tlak plynu (pascaly),

V = objem plynu (m^3),

R = molárna plynová konštanta [8,314 J/(mol K)],

T = inkubačná teplota (kelviny).

Kombináciou rovníc [1] a [2] a racionalizáciou s cieľom vyjadriť tvorbu plynu v slepej kontrolnej vzorke dostaneme:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \qquad \text{Rovnica [3]}$$

kde:

m_h = hmotnosť čistého uhlíka vytvoreného ako plyn v uzavretom priestore nad kvapalinou (mg),

Δp = priemerný rozdiel medzi počiatočným a konečným tlakom v testovacích nádobách mínus príslušný priemer v slepých nádobách (milibary),

V_h = objem uzavretého priestoru nad kvapalinou v nádobe (l),

0,1 = prevod pre newtony/m^2 na milibary a pre m^3 na litre.

Rovnica [4] by sa mala použiť pri normálnej inkubačnej teplote 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{Rovnica [4]}$$

Poznámka: Alternatívny výpočet objemu. Hodnoty na tlakomeri sa prevedú na ml vytvoreného plynu s použitím štandardnej krivky vytvorenej zakreslením vstreknutého objemu (ml) v závislosti od hodnoty na meracom prístroji (dodatok 2). Počet molov (n) plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou v každej nádobe sa vypočíta vydelením kumulatívnej tvorby plynu (ml) číslom 25 286 ml/mol, čo je objem obsadený jedným molom plynu pri teplote 35 °C a štandardnom atmosférickom tlaku. Keďže 1 mol CH_4 i 1 mol CO_2 obsahujú 12 g uhlíka, množstvo uhlíka (mg) v uzavretom priestore nad kvapalinou (*mh*) je dané rovnicou [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{Rovnica [5]}$$

Racionalizácia s cieľom vyjadriť tvorbu plynu v slepej kontrolnej vzorke:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Rovnica [6]}$$

kde:

m_h = hmotnosť čistého uhlíka vytvoreného ako plyn v uzavretom priestore nad kvapalinou (mg),

ΔV = priemerný rozdiel medzi objemom plynu vytvoreným v uzavretom priestore nad kvapalinou v testovacích nádobách a slepých kontrolných nádobách,

25 286 = objem obsadený 1 molom plynu pri teplote 35 °C a tlaku 1 atmosféra.

45. Po biodegradácii možno podľa potreby vytvoriť graf kumulovaného zvýšenia tlaku D*p* (milibary) v závislosti od času. Z tejto krivky identifikujte a zaznamenajte lag fázu (dni). Lag fáza je čas od začiatku testu do začiatku významnej degradácie (príklad nájdete v dodatku 3). Ak sa odoberali a analyzovali priebežné vzorky supernatantu (pozri body 40, 46 a 47), možno namiesto len kumulatívneho tlaku vytvoriť graf pre celkový vytvorený C (v plyne plus v kvapaline).

Uhlík v kvapaline

46. Množstvo metánu v kvapaline sa neberie do úvahy, lebo je známe, že jeho rozpustnosť vo vode je veľmi nízka. Hmotnosť anorganického uhlíka v kvapaline v testovacích nádobách vypočítajte s použitím rovnice [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{Rovnica [7]}$$

kde:

m_l = hmotnosť anorganického uhlíka v kvapaline (mg),

C_{net} = koncentrácia anorganického uhlíka v testovacích nádobách mínus koncentrácia v kontrolných nádobách na konci testu (mg/l),

V_l = objem kvapaliny v nádobe (l).

Celkový splynovaný uhlík

47. Celkovú hmotnosť splynovaného uhlíka v nádobe vypočítajte s použitím rovnice [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Rovnica [8]}$$

kde:

m_t = celková hmotnosť splynovaného uhlíka (mg),

hodnoty m_h a m_l sú vymedzené vyššie.

Uhlík v testovanej látke

48. Hmotnosť uhlíka v testovacích nádobách vytvoreného z pridanej testovanej látky vypočítajte s použitím rovnice [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Rovnica [9]}$$

kde:

m_v = hmotnosť uhlíka v testovanej látke (mg),

C_c = koncentrácia uhlíka v testovanej látke v testovacej nádobe (mg/l),

V_l = objem kvapaliny v testovacej nádobe (l).

Rozsah biodegradácie

49. Vypočítajte percento biodegradácie z plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou pomocou rovnice [10] a celkové percento biodegradácie pomocou rovnice [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Rovnica [10]}$$
$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Rovnica [11]}$$

kde:

D_h = biodegradácia z plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou (%),

D_t = celková biodegradácia (%),

hodnoty m_h, m_v a m_t sú vymedzené vyššie.

Množstvo primárnej biodegradácie sa vypočíta z (voliteľných) meraní koncentrácie testovanej látky na začiatku a konci inkubácie pomocou rovnice [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Rovnica [12]}$$

kde:

D_p = primárna degradácia testovanej látky (%),

S_i = počiatočná koncentrácia testovanej látky (mg/l),

S_e = koncentrácia testovanej látky na konci (mg/l).

Ak metóda analýzy naznačuje významné koncentrácie testovanej látky v neupravenom inokulu anaeróbneho kalu, použite rovnicu [13]:

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

kde:

D_p^1 = upravená primárna degradácia testovanej látky (%),

S_{ib} = počiatočná ‚zjavná' koncentrácia testovanej látky v slepých kontrolných vzorkách (mg/l),

S_{eb} = ‚zjavná' koncentrácia testovanej látky v slepých kontrolných vzorkách na konci (mg/l).

Validita výsledkov

50. Mali by sa použiť len hodnoty tlaku v nádobách, v ktorých sa neobjavilo ružové zafarbenie (pozri bod 33). Kontaminácia kyslíkom sa minimalizuje použitím vhodných metód manipulácie v anaeróbnom prostredí.

51. Treba mať na zreteli, že test je platný, keď referenčná látka dosiahne plató predstavujúce viac ako 60 % biodegradáciu ([1]).

52. Ak pH na konci testu prekročilo rozsah 7 ± 1 a došlo k nedostatočnej biodegradácii, zopakujte test so zvýšenou tlmivou kapacitou média.

([1]) Túto hodnotu je nutné prehodnotiť, ak sa použijú adsorpčné a nerozpustné referenčné chemikálie.

Inhibícia degradácie

53. Tvorba plynu v nádobách obsahujúcich testovanú látku i referenčnú látku by mala byť minimálne rovnaká ako v nádobách obsahujúcich iba referenčnú látku, inak to môže znamenať, že dochádza k inhibícii tvorby plynu. V niektorých prípadoch bude tvorba plynu v nádobách obsahujúcich testovanú látku bez referenčnej látky nižšia ako v slepých kontrolných nádobách, čo naznačuje, že testovaná látka má inhibujúci účinok.

Protokol o skúške

54. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec a relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— čistota (nečistoty) testovanej látky.

Podmienky testu:

— objem zriedenej kvapaliny vo vyhnívacej nádobe (V_l) a objem uzavretého priestoru nad kvapalinou (V_h) v nádobe,

— opis testovacích nádob, hlavné charakteristiky merania bioplynu (napr. typ tlakomera) a analyzátora IC,

— aplikácia testovanej látky a referenčnej látky do testovacieho systému: použitá testovaná koncentrácia a prípadné použitie rozpúšťadiel,

— údaje o použitom inokule: názov čistiarne odpadových vôd, opis zdroja čistených odpadových vôd (napr. prevádzková teplota, retenčný čas kalu, prevažne odpadové vody z domácností atď.), koncentrácia, všetky informácie potrebné na odôvodnenie tohto postupu a informácie o prípadnej predúprave inokula (napr. predbežné vyhnívanie, predexpozícia),

— inkubačná teplota,

— počet replikátov.

Výsledky:

— hodnoty pH a IC na konci testu,

— koncentrácia testovanej látky na začiatku a konci testu, ak sa vykonalo špecifické meranie,

— všetky namerané údaje získané v nádobách s testovanou látkou, slepou vzorkou, referenčnou látkou, prípadne kontrolou inhibície [napr. tlak v milibaroch, koncentrácia anorganického uhlíka (mg/l)] vo forme tabuľky (namerané údaje pre kvapalinu a uzavretý priestor nad kvapalinou sa majú uviesť samostatne),

— štatistické spracovanie údajov, trvanie testu a graf biodegradácie testovanej látky, referenčnej látky a kontroly inhibície,

— percento biodegradácie testovanej látky a referenčnej látky,

— dôvody pre akékoľvek odmietnutie výsledkov testu,

— rozbor výsledkov.

LITERATÚRA

1. Kapitoly tejto prílohy:

C.4, stanovenie ľahkej biodegradovateľnosti;

C.9, biodegradácia – Zahn-Wellensov test;

C.10, simulačný test – aeróbne čistenie odpadových vôd:

A: Jednotky s technológiou aktivovaného kalu, B: Biofilmy

C.11, biodegradácia – respiračno-inhibičný test aktivovaného kalu

2. OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paríž

3. Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. a Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527 – 1550. (publikované aj ako ECETOC Technical Report No. 28, jún 1988).

4. Shelton D.R. a Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850 – 857.

5. Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. a McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485 – 492.

6. Healy, J.B.Jr. a Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84 – 89.

7. Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

8. Battersby, N.S. a Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441 – 2460.

9. E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

10. US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

11. International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.

12. International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.

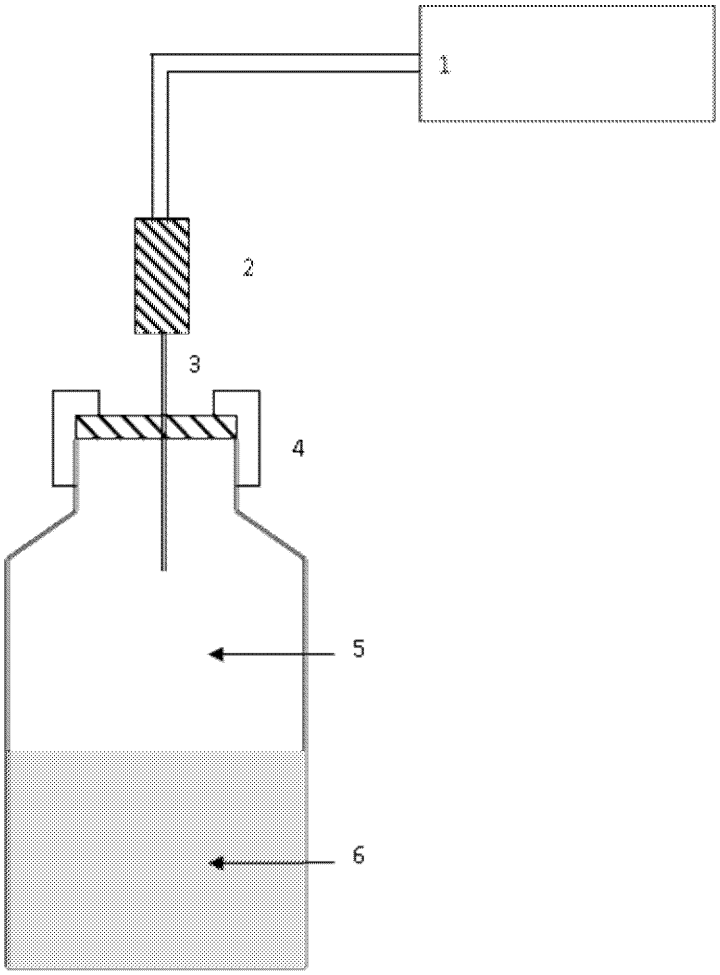
13. International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

14. Pagga, U. a Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499 – 1509.

15. International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

Dodatok 1

Príklad prístroja na meranie tvorby bioplynu pomocou tlaku plynu



Legenda:

1 – Tlakomer

2 – Trojcestný plynotesný ventil

3 – Injekčná ihla

4 – Plynotesné tesnenie (zahnutý uzáver a priehradka)

5 – Uzavretý priestor nad kvapalinou (V_h)

6 – Inokulum spracovaného kalu (V_l)

Testovacie nádoby v prostredí s teplotou 35 °C ± 2 °C

Dodatok 2

Prevod hodnôt na tlakomeri

Hodnoty na tlakomeri možno dať do súvislosti s objemami plynu prostredníctvom štandardnej krivky vytvorenej vstreknutím známych objemov vzduchu pri teplote 35 °C ± 2 °C do sérových fliaš, ktoré obsahujú objem vody rovný objemu reakčnej zmesi V_R:

— pridajte alikvotné časti vody V_R (ml) udržiavanej pri teplote 35 °C ± 2 °C do piatich sérových fliaš, utesnite fľaše a vložte ich na 1 hodinu do vodného kúpeľa pri teplote 35 °C, aby sa dosiahol rovnovážny stav,

— zapnite tlakomer, nechajte ho stabilizovať a nastavte ho na nulu,

— zaveďte injekčnú ihlu cez tesnenie jednej z fliaš, otvorte ventil a nechajte ho otvorený, kým na tlakomeri bude nula, a ventil zatvorte,

— zopakujte postup so zvyšnými fľašami,

— do každej fľaše vstreknite 1 ml vzduchu s teplotou 35 °C ± 2 °C. Zaveďte ihlu (na tlakomeri) cez tesnenie jednej z fliaš a nechajte hodnotu tlaku ustáliť. Zaznamenajte tlak, otvorte ventil a nechajte ho otvorený, kým na tlakomeri bude nula, a ventil zatvorte,

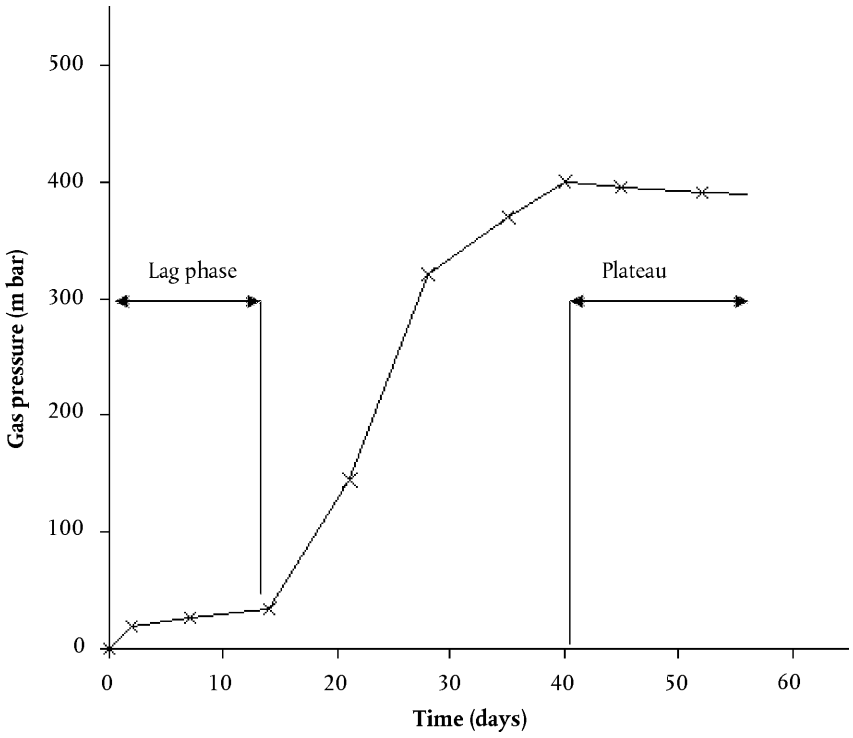
— zopakujte postup so zvyšnými fľašami,

— zopakujte uvedený postup s použitím objemov 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml a 50 ml vzduchu,

— zostrojte prevodovú krivku tlaku (Pa) v závislosti od objemu vstreknutého plynu Vb (ml). Odpoveď prístroja je lineárna v rozsahu 0 – 70 000 Pa a 0 – 50 ml tvorby plynu.

Dodatok 3

Príklad degradačnej krivky (kumulatívne čisté zvýšenie tlaku)



Dodatok 4

Príklad kariet údajov pre test anaeróbnej degradácie – karta údajov pre testovanú látku

Laboratórium: ..... Testovaná látka: ..... Č. testu: .....

Teplota testu (°C): ..... Objem uzavretého priestoru nad kvapalinou (V_h): ... (l) Objem kvapaliny (V_l): ..... (l)

Uhlík v testovanej látke $C_{c,v}$: ..... (mg/l) m_v (1): ..... (mg)

Deň	p_1 (test) (mbar)	p_2 (test) (mbar)	p_3 (test) (mbar)	p (test) priemer (mbar)	p_4 (slepé) (mbar)	p_5 (slepé) (mbar)	p_6 (slepé) (mbar)	p (slepé) priemer (mbar)	p (čisté) test – slepé priemer (mbar)	Δp (čisté) kumulatívne (mbar)	m_h C v priest. nad kvap. (2) (mg)	D_h biodegradácia (3) (%)
	$C_{IC,1}$ test (mg)	$C_{IC,2}$ test (mg)	$C_{IC,3}$ test (mg)	C_{IC} priemer testu (mg)	$C_{IC,4}$ slepé (mg)	$C_{IC,5}$ slepé (mg)	$C_{IC,6}$ slepé (mg)	C_{IC} priemer v slepej vzorke (mg)	$C_{IC,net}$ test – slepé priemer (mg)	m_l kvapalný C (4) (mg)	m_t celkový C (5) (mg)	D_t biodegradácia (6) (%)
IC (koniec)												
pH (koniec)												

(1) Uhlík v testovacej nádobe, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
(2) Uhlík v uzavretom priestore nad kvapalinou, m_h (mg) pri normálnej inkubačnej teplote (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$
(3) Biodegradácia vypočítaná z plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
(4) Uhlík v kvapaline, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
(5) Celkový splynovaný uhlík, m_t (mg): $m_t + m_l$
(6) Celková biodegradácia, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

Laboratórium: ..... Referenčná látka: ..... Č. testu: .....

Teplota testu (°C): ..... Objem uzavretého priestoru nad kvapalinou (V_h): ... (l) Objem kvapaliny (V_l) ..... (litre):

Uhlík v referenčnej látke $C_{c,v}$ ..... (mg/l): m_v (1)(mg):

Deň	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) priemer (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) priemer (mbar)	p (ref.) ref. – slepé (mbar)	Δp (ref.) kumulatívne (mbar)	m_h C v priest. nad kvap. (2) (mg)	D_h biodegradácia (3) (%)
	$C_{IC,1}$ ref. (mg)	$C_{IC,2}$ ref. (mg)	$C_{IC,3}$ ref. (mg)	C_{IC} priemer ref. (mg)	$C_{IC,4}$ inhib. (mg)	$C_{IC,5}$ inhib. (mg)	$C_{IC,6}$ inhib. (mg)	C_{IC} priemer inhib. (mg)	$C_{IC,net}$ ref. – inhib. (mg)	m_l kvapalný C (4) (mg)	m_t celkový C (5) (mg)	D_t biodegradácia (6) (%)
IC (koniec)												
pH (koniec)												

(1) Uhlík v testovacej nádobe, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
(2) Uhlík v uzavretom priestore nad kvapalinou, m_h (mg) pri normálnej inkubačnej teplote (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$
(3) Biodegradácia vypočítaná z plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
(4) Uhlík v kvapaline, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
(5) Celkový splynovaný uhlík, m_t (mg): $m_t + m_l$
(6) Celková biodegradácia, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

C.44. LÚHOVANIE V PÔDNYCH KOLÓNACH

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 312 (2004). Syntetické chemikálie sa do pôdy môžu dostať priamo zámernou aplikáciou (napr. agrochemikálie) alebo nepriamymi cestami (napr. postupnosťou odpadové vody → splaškový kal → pôda alebo vzduch → mokré/suché skládkovanie). Z hľadiska posúdenia rizika týchto chemikálií je dôležité odhadnúť ich potenciál transformácie v pôde a pohybu (lúhovania) do hlbších vrstiev pôdy a napokon do podzemnej vody.

2. K dispozícii je niekoľko metód na meranie potenciálu vylúhovania chemikálií v pôde pri riadených laboratórnych podmienkach, t. j. chromatografia na tenkej vrstve pôdy, chromatografia na hrubej vrstve pôdy, chromatografia v pôdnej kolóne a merania adsorpcie – desorpcie (1) (2). V prípade neionizovaných chemikálií možno použiť rozdeľovaciu konštantu n-oktanol – voda (P_{ow}), ktorá umožňuje skorý odhad ich potenciálu adsorpcie a vylúhovania (3) (4) (5).

3. Metóda opísaná v tejto testovacej metóde je založená na chromatografii v pôdnej kolóne s narušenou pôdou (vymedzenie pojmu pozri v dodatku 1). Uskutočnia sa dva druhy pokusov na stanovenie i) potenciálu vylúhovania testovanej chemikálie a ii) potenciálu vylúhovania produktov transformácie (štúdia s vyzretými rezíduami) v pôdach pri riadených laboratórnych podmienkach ([1]). Testovacia metóda je založená na existujúcich metódach (6) (7) (8) (9) (10) (11).

4. Účastníci seminára OECD o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa uskutočnil v roku 1995 v talianskom meste Belgirate (12), sa dohodli na počte a druhoch pôd, ktoré možno použiť v tejto testovacej metóde. Boli schválené aj odporúčania na odber vzoriek pôdy, manipuláciu s nimi a ich skladovanie pri pokusoch s lúhovaním.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

5. Kolóny vyrobené z vhodného inertného materiálu (napr. sklo, nehrdzavejúca oceľ, hliník, teflón, PVC atď.) sa naplnia pôdou, potom sa nasýtia a nechajú dosiahnuť rovnovážny stav s použitím roztoku ‚umelého dažďa' (vymedzenie pojmu pozri v dodatku 1). Následne sa nechajú odvodniť. Potom sa na povrch každej pôdnej kolóny aplikuje testovaná chemikália a/alebo vyzreté rezíduá testovanej chemikálie. Následne sa do pôdnych kolón aplikuje umelý dážď a odoberie sa výluh. Po procese lúhovania sa pôda vyberie z kolón a rozdelí na primeraný počet segmentov v závislosti od toho, aké informácie má štúdia priniesť. Každý segment pôdy a výluh sa potom analyzujú z hľadiska testovanej chemikálie a podľa potreby aj z hľadiska produktov transformácie alebo iných sledovaných chemikálií.

UPLATNITEĽNOSŤ TESTOVACEJ METÓDY

6. Testovacia metóda sa uplatňuje na testované chemikálie (neoznačené alebo rádioaktívne označené, napr. uhlíkom ^{14}C), pre ktoré existuje analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Testovacia metóda by sa nemala uplatňovať na chemikálie, ktoré sú prchavé z pôdy a vody, teda nezostávajú v pôde a/ani vo výluhu pri experimentálnych podmienkach tejto testovacej metódy.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

7. Na meranie vyplavovania látky zo sedimentu v pôdnych kolónach možno použiť neoznačené alebo rádioaktívne označené testované chemikálie. Rádioaktívne označený materiál sa vyžaduje na skúmanie lúhovania produktov transformácie (vyzretých rezíduí testovanej chemikálie) a na stanovenie hmotnostnej bilancie. Odporúča sa značkovanie izotopom ^{14}C, ale užitočné môžu byť aj iné izotopy, napr. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Značka by sa podľa možnosti mala umiestniť do najstabilnejšej časti (najstabilnejších častí) molekuly. Čistota testovanej chemikálie by mala byť aspoň 95 %.

8. Väčšina chemikálií by sa mala aplikovať ako jedna látka. V prípade účinných látok v prípravkoch na ochranu rastlín však možno na skúmanie lúhovania východiskovej testovanej látky použiť aj zložené produkty. Ich testovanie je potrebné najmä v prípade, že sa predpokladá vplyv zmesi na rýchlosť uvoľňovania (napr. zrnité prípravky alebo prípravky s riadeným uvoľňovaním). Pokiaľ ide o osobitné požiadavky na koncepciu testu v prípade zmesí, môže byť užitočné poradiť sa pred vykonaním testu s regulačným orgánom. V prípade štúdií lúhovania vyzretých rezíduí by sa mala použiť čistá východisková testovaná látka.

([1]) Štúdie lúhovania v kolóne zamerané na prípravky na ochranu plodín môžu poskytnúť informácie o mobilite testovanej chemikálie a produktoch jej transformácie a môžu doplniť štúdie sorpcie.

9. Pred vykonaním testov lúhovania v pôdnych kolónach by podľa možnosti mali byť k dispozícii tieto informácie o testovanej chemikálii:

   1. rozpustnosť vo vode [testovacia metóda A.6] (13);

   2. rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;

   3. tlak pary [testovacia metóda A.4] (13) a Henryho konštanta;

   4. rozdeľovacia konštanta n-oktanol – voda [testovacie metódy A.8 a A.24] (13);

   5. adsorpčný koeficient (K_d, K_f alebo K_{OC}) [testovacie metódy C.18 a/alebo C.19) (13);

   6. hydrolýza (testovacia metóda C.7) (13);

   7. disociačná konštanta (pK_a) (usmernenie OECD TG 112) (25);

   8. aeróbna a anaeróbna transformácia v pôde (testovacia metóda C.23) (13).

   Poznámka: Teplota, pri ktorej sa vykonali tieto merania, sa musí uviesť do príslušných protokoloch o skúške.

10. Množstvo testovanej chemikálie aplikovanej do pôdnych kolón by malo byť dostatočné na zistenie aspoň 0,5 % aplikovanej dávky v jednotlivých segmentoch. V prípade účinných chemikálií v prípravkoch na ochranu rastlín môže množstvo aplikovanej testovanej chemikálie zodpovedať maximálnej odporúčanej dávke na použitie (jedna aplikácia).

11. Musí byť k dispozícii vhodná analytická metóda na kvantifikáciu testovanej chemikálie a podľa potreby produktov jej transformácie v pôde a výluhu so známou správnosťou, presnosťou a citlivosťou. Mal by byť známy aj analytický detekčný limit testovanej chemikálie a významných produktov jej transformácie (zvyčajne aspoň všetkých produktov transformácie ≥10 % aplikovanej dávky pozorovanej v štúdiách spôsobov transformácie, ale podľa možnosti všetkých relevantných produktov transformácie) (pozri bod 17).

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

12. Na vyhodnotenie relatívnej mobility testovanej chemikálie v pôde by sa mali použiť referenčné chemikálie so známymi vlastnosťami lúhovania, ako sú atrazín alebo monurón, ktoré možno v teréne považovať za mierne lúhovacie látky (1) (8) (11). Na potvrdenie hydrodynamických vlastností pôdnej kolóny možno použiť aj nesorbčnú a nedegradovateľnú polárnu referenčnú chemikáliu (napr. trícium, bromid, fluoresceín, eozín), ktorou sa sleduje pohyb vody v kolóne.

13. Užitočné môžu byť aj analytické štandardné chemikálie, ktoré možno použiť na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktov transformácie v pôdnych segmentoch a vo výluhoch chromatografickými, spektroskopickými alebo inými relevantnými metódami.

VYMEDZENIE POJMOV A JEDNOTKY

14. Pozri dodatok 1.

KRITÉRIÁ KVALITY

Výťažok

15. Súčet percentuálnych podielov testovanej chemikálie v segmentoch pôdy a vo výluhu z kolóny po vylúhovaní predstavuje výťažok pokusu s lúhovaním. Výťažky by mali byť v rozpätí od 90 % do 110 % pre rádioaktívne označené chemikálie (11) a od 70 % do 110 % pre neoznačené chemikálie (8).

Opakovateľnosť a citlivosť analytickej metódy

16. Opakovateľnosť analytickej metódy na kvantifikáciu testovanej chemikálie a produktov transformácie možno overiť duplikátnou analýzou rovnakého extraktu segmentu pôdy alebo výluhu (pozri bod 11).

17. Detekčný limit (LOD) analytickej metódy pre testovanú chemikáliu a produkty transformácie by mal byť aspoň 0,01 mg · kg^{-1} v každom segmente pôdy alebo výluhu (ako testovaná chemikália) alebo 0,5 % aplikovanej dávky v jednotlivých segmentoch podľa toho, ktorá hodnota je nižšia. Mal by sa stanoviť aj kvantifikačný limit (LOQ).

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Testovací systém

18. V teste sa použijú lúhovacie kolóny (rozdeliteľné alebo nerozdeliteľné) vyrobené z vhodného inertného materiálu (napr. sklo, nehrdzavejúca oceľ, hliník, teflón, PVC atď.) s vnútorným priemerom najmenej 4 cm a minimálnou výškou 35 cm. Materiály kolóny by sa mali otestovať na možné vzájomné pôsobenie s testovanou chemikáliou a/alebo produktmi jej transformácie. Príklady vhodných rozdeliteľných a nerozdeliteľných kolón sú uvedené v dodatku 2.

19. Na naplnenie a utlačenie pôdnych kolón sa používa lyžica, plunžer a vibračný prístroj.

20. Na aplikovanie umelého dažďa do pôdnych kolón možno použiť piestové alebo peristaltické čerpadlá, sprchové hlavice, Mariottove fľaše alebo jednoduchý prikvapkávací lievik.

Laboratórne vybavenie a chemikálie

21. Vyžaduje sa štandardné laboratórne vybavenie, najmä:

    1. analytické prístroje, napríklad zariadenia GLC, HPLC a TLC vrátane príslušných detekčných systémov na analyzovanie označených alebo neoznačených chemikálií alebo na inverznú metódu riedenia izotopov;
    2. prístroje na účely identifikácie (napr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atď.);
    3. kvapalinové scintilačné počítadlo na rádioaktívne označené chemikálie;
    4. oxidačné činidlo na spaľovanie označeného materiálu;
    5. extrakčný prístroj (napr. odstredivkové skúmavky na extrakciu za studena a Soxhletov prístroj na kontinuálnu extrakciu s refluxom);
    6. zariadenia na koncentrovanie roztokov a extraktov (napr. rotačná odparka).

22. Medzi používané chemikálie patria: organické rozpúšťadlá analytickej čistoty, napr. acetón, metanol atď., scintilačná kvapalina, 0,01 M roztoku $CaCl_2$ v destilovanej alebo deionizovanej vode (= umelý dážď).

Testovaná chemikália:

23. Testovaná chemikália sa do pôdnej kolóny aplikuje rozpustená vo vode (deionizovanej alebo destilovanej). Ak je testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode, možno ju aplikovať buď ako zložený produkt (podľa potreby po suspendovaní alebo emulgovaní vo vode), alebo v akomkoľvek organickom rozpúšťadle. Ak sa použije organické rozpúšťadlo, jeho množstvo by malo byť minimálne a malo by sa odpariť z povrchu pôdnej kolóny pred začiatkom lúhovania. Tuhé prípravky, napríklad granuly, by sa mali aplikovať v tuhej forme bez vody. Na dosiahnutie lepšej distribúcie na povrchu pôdnej kolóny možno zložený produkt pred aplikovaním zmiešať s malým množstvom kremenného piesku (napr. 1 g).

24. Množstvo testovanej chemikálie aplikovanej do pôdnych kolón by malo byť dostatočné na zistenie aspoň 0,5 % aplikovanej dávky v jednotlivých segmentoch. V prípade účinných chemikálií v prípravkoch na ochranu rastlín to môže byť založené na maximálnej odporúčanej dávke na použitie (dávka pri jednej aplikácii), pričom v prípade lúhovania východiskovej chemikálie i vyzretého rezídua by sa malo vychádzať z plochy povrchu použitej pôdnej kolóny ([1]).

([1]) Množstvo, ktoré sa má aplikovať do valcových pôdnych kolón, sa môže vypočítať podľa tohto vzorca:

$$M\,[\mu g] = \frac{A\,[kg/ha] \cdot 10^9\,[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8\,[cm^2/ha] \cdot 4}$$

kde:
M = množstvo použité na kolónu [µg],
A = aplikovaná dávka [kg· ha^{-1}],
d = priemer pôdnej kolóny [cm],
π = 3,14

Referenčná chemikália

25. V pokusoch s lúhovaním by sa mala použiť referenčná chemikália (pozri bod 12). Mala by sa aplikovať na povrch pôdnej kolóny podobným spôsobom ako testovaná chemikália a v primeranom množstve, ktoré umožní dostatočnú detekciu buď ako vnútorný štandard spolu s testovanou chemikáliou v tej istej pôdnej kolóne, alebo samostatne v osobitnej pôdnej kolóne. Vhodnejšie je, aby sa obidve chemikálie aplikovali do tej istej kolóny, okrem prípadov, keď sú obidve chemikálie podobne označené.

Pôdy

Výber pôdy

26. V štúdiách s lúhovaním východiskovej testovanej chemikálie by sa mali použiť tri až štyri pôdy s rôznym pH, obsahom organického uhlíka a textúrou (12). Usmernenie na výber pôd na pokusy s lúhovaním je uvedené ďalej v tabuľke 1. V prípade ionizovateľných testovaných chemikálií by vybraté pôdy mali pokrývať široké rozpätie pH, aby bolo možné vyhodnotiť mobilitu chemikálie v ionizovanej i neionizovanej forme. Aspoň tri pôdy by mali mať pH, pri ktorom je testovaná chemikália v mobilnej forme.

Tabuľka 1

Usmernenie na výber pôd na štúdie s lúhovaním

Č. pôdy	Hodnota pH	Organický uhlík %	Obsah ílu %	Textúra (*)
1	> 7,5	3,5 – 5,0	20 – 40	ílovitá hlina
2	5,5 – 7,0	1,5 – 3,0	15 – 25	siltová hlina
3	4,0 – 5,5	3,0 – 4,0	15 – 30	hlina
4	< 4,0 – 6,0 §	< 0,5 – 1,5 § ‡	< 10 – 15 §	hlinitý piesok
5	< 4,5	> 10 #	< 10	hlinitý piesok/piesok

(*) Podľa systémov FAO a USDA (14).
§ Príslušné premenné by podľa možnosti mali mať hodnoty v uvedenom rozsahu. Ak sa však vyskytnú ťažkosti s hľadaním vhodného pôdneho materiálu, prijateľné sú aj hodnoty nižšie ako uvedené minimum.
‡ Pôdy s menej ako 0,3 % organického uhlíka môžu narušiť koreláciu medzi obsahom organických látok a adsorpciou. Preto sa odporúča použiť pôdy s minimálnym obsahom organického uhlíka 0,3 %.
# Pôdy s veľmi vysokým obsahom uhlíka (napr. > 10 %) nemusia byť prijateľné z právneho hľadiska, napr. na účely registrácie pesticídov.

27. Iné druhy pôd môžu byť niekedy potrebné na zastúpenie chladnejších, miernych a tropických oblastí. Ak sa teda uprednostňujú iné druhy pôdy, musia sa charakterizovať rovnakými parametrami a mali by mať podobné odchýlky vo vlastnostiach ako pôdy opísané v usmernení na výber pôd na štúdie s lúhovaním (pozri tabuľku 1), aj keď presne nezodpovedajú kritériám.

28. V štúdiách lúhovania s ‚vyzretými rezíduami' by sa mala použiť jedna pôda (12). Mala by mať obsah piesku > 70 % a obsah organického uhlíka 0,5 až 1,5 % (napr. pôda č. 4 v tabuľke 1). Použitie viacerých druhov pôd môže byť potrebné v prípade, keď dôležitú informáciu predstavujú údaje o produktoch transformácie.

29. Všetky pôdy je potrebné charakterizovať aspoň z hľadiska textúry [% piesku, % siltu, % ílu podľa klasifikačných systémov FAO a USDA (14)], pH, kapacity výmeny katiónov, obsahu organického uhlíka, sypnej hustoty (pre narušené pôdy) a kapacity retencie vody. Meranie mikrobiálnej biomasy sa vyžaduje len v prípade pôdy použitej v období zretia/v inkubačnom období pred pokusom s lúhovaním vyzretých rezíduí. Informácie o ďalších vlastnostiach pôdy (napr. klasifikácii pôdy, mineralógii ílu, špecifickej povrchovej ploche) môžu byť užitočné na interpretáciu výsledkov tejto štúdie. Na určenie vlastností pôdy možno použiť metódy odporúčané v literatúre (15) (16) (17) (18) (19).

Odber a skladovanie pôd

30. Pôdy by sa mali odobrať z vrchnej vrstvy (horizontu A), ktorej hĺbka neprekračuje 20 cm. Je nutné odstrániť zvyšky vegetácie, makrofauny a kameňov. Pôdy (okrem tých, ktoré sa používajú na zretie testovanej chemikálie) sa vysušia vzduchom pri izbovej teplote (odporúča sa 20 – 25 °C). Disagregácia by sa mala vykonať s minimálnou silou, aby sa čo najmenej zmenila pôvodná textúra pôdy. Pôda sa preoseje cez sito s okami ≤ 2 mm. Odporúča sa opatrná homogenizácia, lebo sa tým zvyšuje reprodukovateľnosť výsledkov. Pred použitím možno pôdy skladovať pri teplote okolia a vysušené vzduchom (12). Neexistuje odporúčaný limit skladovania, ale pôdy, ktoré sa skladovali dlhšie než tri roky, by sa pred použitím mali znova analyzovať z hľadiska obsahu organického uhlíka a pH.

31. Mali by byť dostupné podrobné informácie o histórii lokalít, z ktorých sa testované pôdy odobrali. Údaje zahŕňajú presnú polohu [presne vymedzenú súradnicami UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/ European Horizontal Datum) alebo zemepisnými súradnicami], vegetačnú pokrývku, aplikáciu chemikálií na ochranu plodín, aplikáciu organických a anorganických hnojív, pridanie biologických materiálov alebo náhodnú kontamináciu (12). Ak sa do pôdy v priebehu predchádzajúcich štyroch rokov aplikovala testovaná chemikália alebo jej štrukturálne analógy, nemala by sa používať na štúdie lúhovania.

Podmienky testu

32. Počas trvania testu sa pôdne kolóny na lúhovanie majú držať v tme pri teplote okolia, pokiaľ sa táto teplota udržiava v rozmedzí ± 2 °C. Odporúča sa teplota 18 až 25 °C.

33. Na povrch pôdnych kolón sa má nepretržite aplikovať umelý dážď (0,01 M $CaCl_2$) s rýchlosťou 200 mm za obdobie 48 hodín ([1]). Táto rýchlosť zodpovedá aplikácii 251 ml do kolóny s vnútorným priemerom 4 cm. Ak to je potrebné na účely testu, možno navyše použiť aj iné rýchlosti aplikácie umelého dažďa a dlhšie trvanie.

Vykonanie testu

Lúhovanie s východiskovou testovanou chemikáliou

34. Do lúhovacích stĺpcov aspoň v duplikátoch sa pridá nespracovaná, vzduchom vysušená a preosiata pôda (< 2 mm) do výšky približne 30 cm. Na to, aby bola pôda rovnomerne utlačená, sa pridáva do kolón v malých dávkach lyžicou a plunžerom sa stlačí za súčasného mierneho trasenia kolónou dovtedy, kým vrchná vrstva pôdy v kolóne neprestane klesať. Rovnomerné utlačenie je potrebné na získanie reprodukovateľných výsledkov v lúhovacích kolónach. Podrobnosti o metódach utláčania kolón nájdete v odkazoch (20), (21) a (22). Na kontrolu reprodukovateľnosti postupu utláčania sa stanoví celková hmotnosť pôdy utlačenej v kolónach ([2]). Hmotnosť duplikátov kolón by mala byť podobná.

([1]) Tým sa simulujú extrémne intenzívne zrážky. Priemerný ročný úhrn zrážok napríklad v strednej Európe je rádovo 800 – 1 000 mm.
([2]) Príklady sypnej hustoty narušených pôd:
piesčitá pôda 1,66 $g \cdot ml^{-1}$,
hlinitá piesčitá pôda 1,58 $g \cdot ml^{-1}$,
hlinitá pôda 1,17 $g \cdot ml^{-1}$,
siltová pôda 1,11 $g \cdot ml^{-1}$.

35. Po utlačení sa pôdne kolóny predzvlhčia umelým dažďom (0,01 M $CaCl_2$) zdola nahor, aby sa vodou vytlačil vzduch z pórov pôdy. Potom sa pôdne kolóny nechajú dosiahnuť rovnovážny stav a nadbytočná voda odtečie pôsobením gravitácie. Metódy nasýtenia kolón sú zhrnuté v literatúre (23).

36. Následne sa do pôdnych kolón aplikuje testovaná chemikália a/alebo referenčná chemikália (pozri aj body 23 – 25). Na získanie homogénnej distribúcie by sa roztoky, suspenzie alebo emulzie testovanej a/alebo referenčnej chemikálie mali rovnomerne aplikovať na povrch pôdnych kolón. Ak sa na účely aplikácie testovanej chemikálie odporúča zapracovanie do pôdy, chemikália sa má zmiešať s malým množstvom pôdy (napr. 20 g) a pridať na povrch pôdnej kolóny.

37. Povrchy pôdnych kolón sa potom zakryjú kotúčom zo sintrového skla, sklenenými perlami, filtrami zo sklených vlákien alebo okrúhlym filtračným papierom, aby sa umelý dážď rovnomerne rozložil na celý povrch a aby sa predišlo narušeniu povrchu pôdy dažďovými kvapkami. Čím väčší je priemer kolóny, tým opatrnejšie sa do pôdnych kolón musí aplikovať umelý dážď, aby sa zabezpečilo rovnomerné rozdelenie umelého dažďa na povrchu pôdy. Potom sa umelý dážď pridáva po kvapkách do pôdnych kolón pomocou piestového alebo peristaltického čerpadla alebo prikvapkávacieho lievika. Výluhy sa podľa možnosti majú odoberať vo frakciách a majú sa zaznamenať ich príslušné objemy ([1]).

38. Po vylúhovaní a odvodnení kolón sa pôda v kolónach rozdelí na vhodný počet segmentov v závislosti od informácií, ktoré sa majú v štúdii získať. Segmenty sa extrahujú príslušnými rozpúšťadlami alebo zmesami rozpúšťadiel a analyzujú z hľadiska testovanej chemikálie a podľa potreby produktov transformácie, celkovej rádioaktivity a referenčnej chemikálie. Výluhy alebo frakcie výluhov sa analyzujú z hľadiska rovnakých produktov priamo alebo po extrakcii. Ak sa používa rádioaktívne označená testovaná chemikália, mali by sa identifikovať všetky frakcie obsahujúce ≥ 10 % aplikovanej rádioaktivity.

Lúhovanie s vyzretými rezíduami

39. Do čerstvej pôdy (vopred nevysušenej vzduchom) sa pridáva rádioaktívne označená testovaná chemikália v množstve zodpovedajúcom povrchovej ploche pôdnych kolón (pozri bod 24). Pôda sa inkubuje v aeróbnych podmienkach podľa testovacej metódy C.23 (13). Inkubačné obdobie (obdobie zretia) by malo byť dostatočne dlhé na to, aby sa vytvorilo významné množstvo produktov transformácie. Odporúča sa obdobie zretia zodpovedajúce jednému polčasu testovanej chemikálie ([2]), pričom toto obdobie by nemalo presiahnuť 120 dní. Pred vylúhovaním sa vyzretá pôda analyzuje z hľadiska testovanej chemikálie a produktov jej transformácie.

40. Lúhovacie kolóny sa naplnia do výšky 28 cm rovnakou pôdou (ale vysušenou vzduchom), aká sa používa v pokuse s vyzretými rezíduami opísanom v bode 34. Stanoví sa aj celková hmotnosť naplnených pôdnych kolón. Pôdne kolóny sa potom predzvlhčia podľa opisu v bode 35.

41. Testovaná chemikália a produkty jej transformácie sa následne aplikujú na povrchu pôdnych kolón vo forme vyzretých pôdnych rezíduí (pozri bod 39) ako 2 cm segment pôdy. Celková výška pôdnych kolón (neošetrená pôda + vyzretá pôda) by podľa možnosti nemala prekročiť 30 cm (pozri bod 34).

42. Lúhovanie sa vykoná podľa opisu v bode 37.

43. Po vylúhovaní sa segmenty pôdy a výluhy analyzujú z hľadiska testovanej chemikálie, produktov jej transformácie a neextrahovanej rádioaktivity podľa opisu v bode 38. Na stanovenie množstva vyzretého rezídua, ktoré po vylúhovaní zostalo vo vrchnej 2 cm vrstve, by sa tento segment mal analyzovať samostatne.

([1]) Typický objem výluhu je v rozsahu 230 – 260 ml, čo zodpovedá približne 92 – 104 % celkového objemu aplikovaného umelého dažďa (251 ml) v prípade pôdnych kolón s priemerom 4 cm a dĺžkou 30 cm.

([2]) V pôde sa môže vytvoriť viacero významných produktov transformácie, ktoré sa môžu objaviť v rôznych časových bodoch štúdie transformácie. V týchto prípadoch môže byť potrebné vykonať štúdie lúhovania s vyzretými rezíduami rôzneho veku.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

44. Množstvá testovanej chemikálie, produktov transformácie, neextrahovateľných zložiek a referenčnej chemikálie, ak sa použije, by sa mali uvádzať v % z pôvodne aplikovanej dávky pre každý segment pôdy a frakciu výluhu. Pre každú kolónu sa má uviesť grafické znázornenie na grafe so zistenými percentami ako funkciou hĺbky pôdy.

45. Ak sa v týchto štúdiách lúhovania v kolónach použije referenčná chemikália, vylúhovanie chemikálie možno vyhodnotiť na relatívnej stupnici pomocou faktorov relatívnej mobility (RMF, vymedzenie pojmu nájdete v dodatku 3) (1) (11), ktoré umožňujú porovnať údaje o vylúhovaní rôznych chemikálií získané v rôznych druhoch pôd. Príklady hodnôt RMF pre rôzne chemikálie na ochranu plodín sú uvedené v dodatku 3.

46. Zo štúdií lúhovania v kolónach možno získať aj odhady hodnôt K_{oc} (normalizovaný adsorpčný koeficient pre organický uhlík) a K_{om} (normalizovaný distribučný koeficient pre organickú hmotu) s použitím priemernej vzdialenosti lúhovania alebo stanovenej korelácie medzi hodnotami RMF a K_{om}, resp. K_{oc} (4) alebo aplikovaním jednoduchej chromatografickej teórie (24). Posledná metóda by sa však mala používať s opatrnosťou, najmä ak vezmeme do úvahy, že proces lúhovania nezahŕňa len podmienky nasýteného prietoku, ale skôr nenasýtené systémy.

Interpretácia výsledkov

47. Štúdie lúhovania v kolónach opísané v tejto metóde umožňujú stanoviť potenciál lúhovania alebo mobility testovanej chemikálie (v štúdii lúhovania východiskovej chemikálie) a/alebo produktov jej transformácie (v štúdii lúhovania vyzretých rezíduí) v pôde. Tieto testy síce kvantitatívne nepredpovedajú vyplavovanie látky zo sedimentu v terénnych podmienkach, ale môžu sa použiť na porovnanie ‚vylúhovateľnosti' jednej chemikálie s inými, ktorých vlastnosti lúhovania sú známe (24). V testoch sa ani kvantitatívne nemeria percento aplikovanej chemikálie, ktorá sa môže dostať do podzemnej vody (11). Výsledky štúdií lúhovania v kolónach však môžu pomôcť pri rozhodovaní o tom, či sa má vykonať ďalšie poloterénne alebo terénne testovanie chemikálií, ktoré majú v laboratórnych testoch vysoký potenciál mobility.

Protokol o skúške

48. Protokol musí obsahovať:

Testovaná chemikália a referenčná chemikália (ak sa použije):

— bežný názov, chemický názov (názvoslovie IUPAC a CAS), číslo CAS, chemická štruktúra (s vyznačením polohy značky, ak sa používa rádioaktívne označený materiál) a relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— čistota (nečistoty) testovanej chemikálie,

— rádiochemická čistota označenej chemikálie a špecifická aktivita (v prípade potreby).

Testované pôdy:

— údaje o mieste odberu,

— vlastnosti pôdy, ako je pH, obsah organického uhlíka a ílu, textúra a sypná hustota (pre narušené pôdy),

— mikrobiálna činnosť v pôde (iba pre pôdy použité na zretie testovanej chemikálie),

— dĺžka skladovania pôdy a podmienky skladovania.

Podmienky testu:

— dátumy vykonávania štúdií,

— dĺžka a priemer lúhovacích kolón,

— celková hmotnosť pôdy v pôdnych kolónach,

— množstvo testovanej chemikálie a podľa potreby referenčnej chemikálie,

— množstvo aplikovaného umelého dažďa a frekvencia a trvanie aplikácie,

— teplota pokusnej zostavy,

— počet replikácií (aspoň dve),

— metódy na analýzu testovanej chemikálie, produktov transformácie a podľa potreby referenčnej chemikálie v rôznych segmentoch pôdy a výluhoch,

— metódy na charakterizovanie a identifikáciu produktov transformácie v segmentoch pôdy a výluhoch.

Výsledky testu:

— tabuľky výsledkov vyjadrených ako koncentrácie a ako % aplikovanej dávky pre segmenty pôdy a výluhy,

— hmotnostná bilancia, ak to je vhodné,

— objemy výluhu,

— vzdialenosti lúhovania a podľa potreby faktory relatívnej mobility,

— grafické znázornenie % zisteného v segmentoch pôdy v závislosti od hĺbky segmentu pôdy,

— rozbor a interpretácia výsledkov.

LITERATÚRA

1. Guth, J.A., Burkhard, N. a Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

2. Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

3. Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050 – 1059.

4. Chiou, C.T., Porter, P.E. a Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227 – 231.

5. Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26 – 33.

6. US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

7. Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

8. Príloha I k smernici Komisie 95/36/ES zo 14. júla 1995, ktorou sa mení a dopĺňa smernica Rady 91/414/EHS o umiestnení prípravkov na ochranu rastlín na trh, Ú. v. ES L 172, 22.7.1995, s. 8.

9. Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10. BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4 – 2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

11. SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

12. OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18. – 20. januára 1995.

13. Kapitoly tejto prílohy:

    Kapitola A.4, tlak pary

    Kapitola A.6, rozpustnosť vo vode

    Kapitola A.8, rozdeľovacia konštanta, metóda trepačkovej banky

    Kapitola A.24, rozdeľovacia konštanta, metóda HPLC

    Kapitola C.7, degradácia — abiotická degradácia: hadrolýza ako funkcia pH

    Kapitola C.18, adsorpcia/desorpcia s použitím rovnovážnej metódy dávkovania

    Kapitola C.23, aeróbna a anaeróbna transformácia v pôde

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

15. Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

16. Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller a D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

17. ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

18. Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

19. Scheffer, F. a Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

20. Weber, J.B. a Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73 – 78.

21. Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. a Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N. D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190 – 200.

22. Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49 – 53.

23. Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177 – 217.

24. (Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115 – 133. Plenum Press, New York.

25. OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paríž

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov a jednotky

Vyzreté rezíduum pôdy: testovaná chemikália a produkty transformácie prítomné v pôde po aplikácii a dostatočne dlhom období na to, aby došlo k procesom presunu, adsorpcie, metabolizmu a rozptylu, ktoré zmenia distribúciu a chemickú povahu niektorých aplikovaných chemikálií (1).

Umelý dážď: 0,01 M roztoku $CaCl_2$ v destilovanej alebo deionizovanej vode.

Priemerná vzdialenosť lúhovania: spodná časť pôdy, kde sa kumulatívne množstvo získanej chemikálie = 50 % z celkového množstva získanej chemikálie (pokus s bežným vylúhovaním), alebo hodnote vypočítanej podľa vzorca (spodná časť pôdy, kde sa kumulatívne množstvo získanej chemikálie = 50 % z celkového množstva získanej chemikálie) – [(hrúbka vrstvy vyzretého rezídua)/2] (štúdia lúhovania vyzretého rezídua).

Chemikália: látka alebo zmes.

Výluh: vodná fáza vylúhovaná cez pôdny profil alebo pôdnu kolónu (1).

Lúhovanie: proces, prostredníctvom ktorého sa chemikália pohybuje smerom nadol cez pôdny profil alebo pôdnu kolónu (1).

Vzdialenosť lúhovania: najhlbší segment pôdy, v ktorom sa po procese lúhovania našlo ≥ 0,5 % aplikovanej testovanej chemikálie alebo vyzretého rezídua (ekvivalent hĺbky prieniku).

Detekčný limit (LOD) a **kvantifikačný limit (LOQ)**: detekčný limit (LOD) je koncentrácia chemikálie, pod ktorou nemožno chemikáliu odlíšiť od analytických artefaktov. Kvantifikačný limit (LOQ) je koncentrácia chemikálie, pod ktorou nemožno stanoviť koncentráciu s prípustnou presnosťou.

RMF – faktor relatívnej mobility: [vzdialenosť lúhovania testovanej chemikálie (cm)]/[vzdialenosť lúhovania referenčnej chemikálie (cm)].

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Produkt transformácie: všetky chemikálie, ktoré sú výsledkom biotických alebo abiotických transformačných reakcií testovanej chemikálie vrátane CO_2 a produktov viazaných v rezíduách.

Pôda: zmes anorganických a organických chemických zložiek. Medzi organické zložky patria zlúčeniny s vysokým obsahom uhlíka a dusíka a vysokou molekulovou hmotnosťou. V pôde žijú malé (väčšinou mikroskopické) organizmy. S pôdou možno manipulovať v dvoch stavoch:

— nenarušenom, teda v stave, ktorý vznikol pôsobením času vytvorením charakteristických vrstiev rôznych druhov pôdy,

— narušenom, aký sa väčšinou nachádza v ornej pôde alebo aký vzniká, keď sa vzorky odobrali výkopom a použili v tejto testovacej metóde (2).

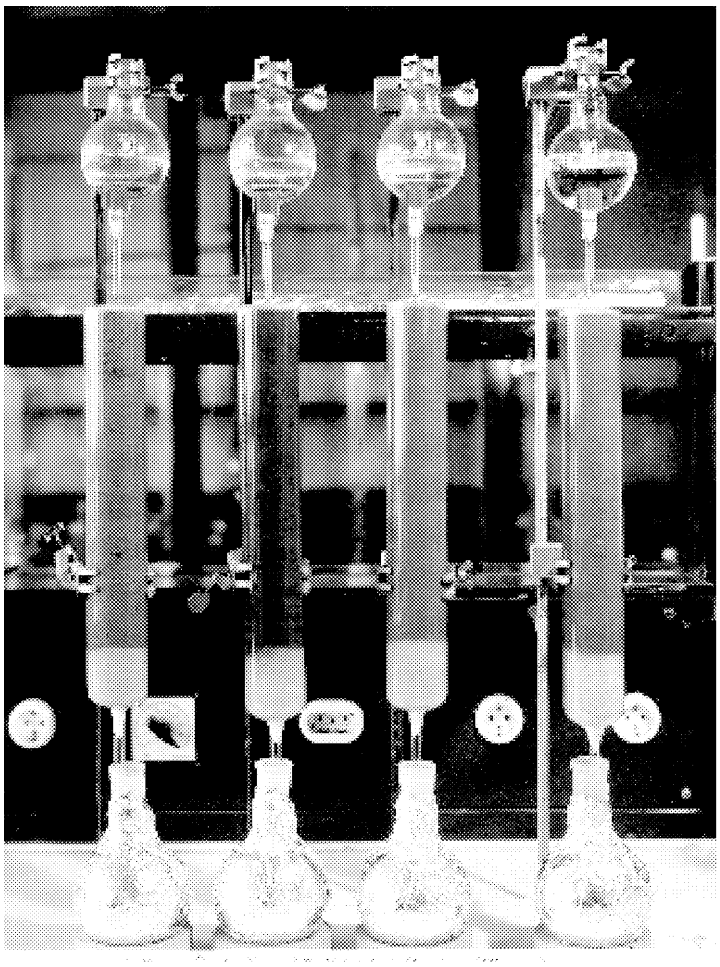
1. Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167 – 1193.

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

Dodatok 2

Obrázok 1

Príklad nerozdeliteľných lúhovacích kolón vyrobených zo skla s dĺžkou 35 cm a vnútorným priemerom 5 cm (1)



← Prikvapkávacie lieviky na aplikovanie umelého dažďa

← Kotúč zo sintrového skla na zabránenie narušeniu povrchu pôdy a na rovnomernú distribúciu umelého dažďa

← Sklenená kolóna naplnená testovanou pôdou (pri testovaní produktov citlivých na svetlo sa kolóny majú obaliť hliníkovou fóliou)

← Vrstva kremenného piesku

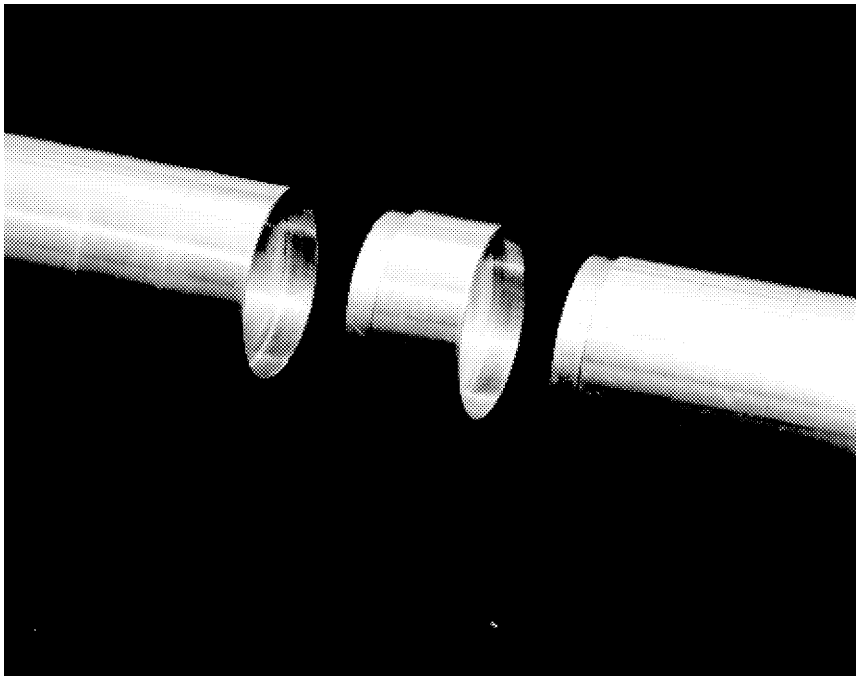
← Zátka zo sklenej vaty na udržanie pôdy v kolóne

← Kadička s guľatým spodkom na zber výluhu zabalená v hliníkovej fólii na zabránenie fotolýze

1. Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225 – 236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

Obrázok 2

Príklad rozdeliteľnej kovovej kolóny s vnútorným priemerom 4 cm (1)



1. Burkhard, N., Eberle D.O. a Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203 – 213.

Dodatok 3

Príklady faktorov relatívnej mobility (*) (RMF) pre rôzne chemikálie na ochranu plodín (1) (2) a zodpovedajúce triedy mobility +

Rozsah RMF	Chemikália (RMF)	Trieda mobility
≤ 0,15	Paratión (< 0,15), fluórdifén (0,15)	I nemobilné
0,15 – 0,8	Profenofos (0,18), propikonazol (0,23), diazinón (0,28), diurón (0,38), terbutylazín (0,52), metidatión (0,56), prometrín (0,59), propazín (0,64), alachlór (0,66), metolachlór (0,68)	II mierne mobilné
0,8 – 1,3	Monurón (**) (1,00), atrazín (1,03), simazín (1,04), fluometurón (1,18)	III stredne mobilné
1,3 – 2,5	Prometón (1,67), kyánazín (1,85), brómacil (1,91), karbutilát (1,98)	IV dosť mobilné
2,5 – 5,0	Karbofurán (3,00), dioxakarb (4,33)	V mobilné
> 5,0	Monokrotofos (> 5,0), dikrotofos (> 5,0)	VI veľmi mobilné

(*) Faktor relatívnej mobility sa odvodzuje takto (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{vzdialenosť lúhovania testovanej chemikálie (cm)}}{\text{vzdialenosť lúhovania referenčnej chemikálie (cm)}}$$

(**) Referenčná chemikália

\+ Iné systémy klasifikácie mobility chemikálie v pôde sú založené na hodnotách R_f získaných chromatografiou na tenkej vrstve pôdy (4) a na hodnotách K_{oc} (5) (6).

1. Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium ‚Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.' Canterbury, UK, 1. – 3. júla 1985.

2. Guth, J.A. a 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. a Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

6. Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165 – 174.

C.45. ODHAD EMISIÍ Z DREVA OŠETRENÉHO OCHRANNÝM PROSTRIEDKOM DO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA: LABORATÓRNA METÓDA PRE DREVENÉ KOMODITY BEZ POVRCHOVEJ ÚPRAVY, KTORÉ SÚ V KONTAKTE SO SLADKOU VODOU ALEBO MORSKOU VODOU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 313 (2007). Emisie z dreva ošetreného ochranným prostriedkom do životného prostredia je potrebné kvantifikovať, aby bolo možné posúdiť riziko ošetreného dreva pre životné prostredie. Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu na stanovenie emisií z dreva ošetreného ochranným prostriedkom v dvoch situáciách, v ktorých sa emisie môžu dostať do životného prostredia:

   — Emisie z ošetreného dreva v kontakte so sladkou vodou. Emisie z povrchu ošetreného dreva sa môžu dostať do vody.

   — Emisie z ošetreného dreva v kontakte s morskou vodou. Emisie z povrchu ošetreného dreva sa môžu dostať do morskej vody.

2. Táto testovacia metóda je určená na testovanie emisií z dreva a drevených komodít bez povrchovej úpravy, ktoré sú v kontakte so sladkou vodou alebo morskou vodou. Triedy použitia sa používajú na medzinárodnej úrovni na kategorizáciu biologického nebezpečenstva, ktoré spôsobuje ošetrená komodita. Triedy použitia slúžia aj na vymedzenie situácie, v ktorej sa používa ošetrená komodita, a na stanovenie zložiek životného prostredia (ovzdušie, voda, pôda), ktoré sú potenciálne ohrozené drevom ošetreným ochranným prostriedkom.

3. Testovacia metóda je laboratórny postup získavania vzoriek (emisátu) z vody použitej na ponorenie ošetreného dreva vo zvyšujúcich sa časových intervaloch po expozícii. Množstvo emisií v emisáte sa dá do súvislosti s plochou povrchu dreva a dĺžkou expozície, pomocou ktorých sa odhadne tok v $mg/m^2/deň$. Možno tak odhadnúť tok (rýchlosť lúhovania) po predĺžení intervalov expozície.

4. Množstvo emisií sa môže použiť na posúdenie rizika ošetreného dreva pre životné prostredie.

ÚVODNÉ ÚVAHY

5. Mechanizmus lúhovania sladkou vodou na povrchu dreva sa nepovažuje za identický s lúhovaním z povrchu dreva morskou vodou, pokiaľ ide o jeho povahu a závažnosť. V prípade produktov alebo zmesí na ochranu dreva slúžiacich na ošetrenie dreva používaného v morskom prostredí je preto nutné vykonať štúdiu lúhovania z dreva pre morskú vodu.

6. Drevo ošetrené ochranným prostriedkom na drevo by malo predstavovať komerčne používané drevo. Malo by sa s ním zaobchádzať v súlade s pokynmi výrobcu ochranného prostriedku a s príslušnými normami a špecifikáciami. Je nutné uviesť parametre úpravy dreva po ošetrení pred začatím testu.

7. Použité vzorky dreva by mali predstavovať používané komodity (napr. pokiaľ ide o druh, hustotu a iné vlastnosti).

8. Test možno použiť na drevo s využitím procesu prieniku alebo povrchovej aplikácie alebo na ošetrené drevo, ktoré obsahuje doplnkovú povinnú povrchovú úpravu (napr. aplikovanú farbu ako požiadavku na komerčné použitie).

9. Na stanovenie množstva, obsahu a povahy emisií z dreva je nutné poznať zloženie, množstvo, pH a fyzikálnu formu vody.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

10. Skúšobné vzorky dreva ošetrené ochranným prostriedkom sa ponoria do vody. Voda (emisát) sa odoberie a chemicky analyzuje počas expozičného obdobia toľkokrát, aby to stačilo na štatistické výpočty. Z analytických výsledkov sa vypočítajú rýchlosti emisie v $mg/m^2/deň$. Je potrebné zaznamenať časy odberu vzoriek. Testy s neošetrenými vzorkami možno zastaviť, ak sa nezistí žiadne pozadie v prvých troch bodoch zberu údajov.

11. Zahrnutie vzoriek neošetreného dreva umožňuje stanoviť úrovne emisátov z dreva v pozadí iných, ako je použitý ochranný prostriedok.

KRITÉRIÁ KVALITY

Správnosť

12. Správnosť testovacej metódy, pokiaľ ide o odhad emisií, závisí od toho, či testované vzorky predstavujú komerčne ošetrené drevo, do akej miery voda zodpovedá skutočnej vode a do akej miery režim expozície zodpovedá prírodným podmienkam.

13. Správnosť, presnosť a opakovateľnosť analytickej metódy by sa mali stanoviť pred vykonaním testu.

Reprodukovateľnosť

14. Odoberú a analyzujú sa tri vzorky vody, pričom ako hodnota emisií sa použije priemerná hodnota. Reprodukovateľnosť výsledkov v rámci jedného laboratória a medzi rôznymi laboratóriami závisí od režimu ponárania a dreva použitého ako skúšobná vzorka.

Prijateľný rozsah výsledkov

15. Prijateľný rozsah výsledkov tohto testu je taký, kde sa horné a spodné hodnoty líšia o menej ako jednu rádovú hodnotu.

PODMIENKY TESTU

Voda

16. Scenáre lúhovania sladkou vodou: Keď sa má v teste lúhovania vyhodnotiť drevo vystavené sladkej vode, odporúča sa použiť deionizovanú vodu (napr. ASTM D 1193 typ II). Teplota vody má byť 20 °C ± 2 °C. Do protokolu o skúške je potrebné uviesť nameranú hodnotu pH a teplotu vody. Analýza vzoriek použitej vody odobratých pred ponorením ošetrených vzoriek umožňuje odhadnúť analyzované chemikálie vo vode. Používa sa ako kontrola na určenie úrovní chemikálií, ktoré sa potom chemicky analyzujú, v pozadí.

17. Scenáre lúhovania morskou vodou: Keď sa má v teste lúhovania vyhodnotiť drevo vystavené morskej vode, odporúča sa použiť umelú morskú vodu (napr. ASTM D 1141, náhradná oceánska voda bez ťažkých kovov). Teplota vody má byť 20 °C ± 2 °C. Do protokolu o skúške je potrebné uviesť nameranú hodnotu pH a teplotu vody. Analýza vzoriek použitej vody odobratých pred ponorením ošetrených vzoriek umožňuje odhadnúť analyzované chemikálie vo vode. Používa sa ako kontrola na analýzu úrovní dôležitých chemikálií v pozadí.

Skúšobné vzorky dreva

18. Druh dreva by mal byť typickým druhom dreva používaným na testovanie účinnosti ochranných prostriedkov na drevo. Odporúčané druhy sú *Pinus sylvestris L.* (borovica lesná), *Pinus resinosa Ait.* (borovica smolná) alebo *Pinus spp.* (rod borovica). Môžu sa urobiť aj doplnkové testy s použitím iných druhov.

19. Malo by sa použiť rovné vláknité drevo bez uzlov. Materiál živicového vzhľadu by sa nemal používať. Drevo musí byť typickým komerčne dostupným drevom. Treba zaznamenať zdroj, hustotu a počet letokruhov na 10 mm.

20. Odporúča sa, aby skúšobné vzorky dreva boli súbory piatich blokov s veľkosťou podľa normy EN 113 (rozmery 25 mm × 50 mm × 15 mm) s pozdĺžnymi plochami rovnobežnými s vláknom dreva. Možno však použiť aj iné rozmery, napríklad 50 mm x 150 mm x10 mm. Skúšobná vzorka sa má úplne ponoriť do vody. Skúšobné vzorky sa musia 100 % skladať z beľového dreva. Každá vzorka sa jedinečne označí, aby ju počas testu bolo možné identifikovať.

21. Všetky skúšobné vzorky by mali mať rovný povrch alebo by sa mali narezať tak, aby mali rovný povrch, a povrchy by sa nemali šmirgľovať.

22. Počet súborov testovaných vzoriek dreva použitých na analýzu je aspoň päť: tri súbory vzoriek sa ošetria ochranným prostriedkom, jeden súbor vzoriek sa neošetrí a jeden súbor vzoriek sa použije na odhadnutie obsahu vlhkosti skúšobných vzoriek vysušených v peci pred ošetrením. Pripraví sa dostatočné množstvo skúšobných vzoriek, aby bolo možné vybrať tri súbory vzoriek, ktoré sú v rozmedzí 5 % priemernej hodnoty retencie ochranného prostriedku v skupine skúšobných vzoriek.

23. Všetky skúšobné vzorky sa na konci utesnia chemikáliou, ktorá zabraňuje prieniku ochranného prostriedku do koncového vlákna vzoriek alebo lúhovaniu zo vzorky cez koncové vlákno. Pri aplikovaní koncovej tesniacej látky je potrebné rozlišovať medzi vzorkami použitými na povrchovú aplikáciu a na procesy prieniku. Koncová tesniaca látka sa musí aplikovať pred ošetrením iba v prípade povrchovej aplikácie.

24. V prípade procesov prieniku musí byť koncové vlákno otvorené, aby bolo možné drevo ošetriť. Vzorky sa teda musia na konci utesniť až na konci obdobia úpravy. Emisie sa odhadujú len pre pozdĺžne povrchové plochy. Tesniace látky sa pred začiatkom lúhovania musia skontrolovať a podľa potreby aplikovať znova. Po začiatku lúhovania by sa už nemali aplikovať.

Ponorná nádoba

25. Nádoba je vyrobená z inertného materiálu a je dostatočne veľká na to, aby sa do nej zmestilo päť vzoriek dreva podľa normy EN 113 v 500 ml vody, teda s pomerom povrchovej plochy k objemu vody 0,4 cm^2/ml.

Zostava na testovanie vzoriek

26. Skúšobné vzorky sú pripevnené na zostave, ktorá umožňuje kontakt všetkých vystavených povrchov vzorky s vodou.

POSTUP OŠETRENIA OCHRANNÝM PROSTRIEDKOM

Príprava ošetrených skúšobných vzoriek

27. Skúšobná vzorka dreva, ktorá sa má v teste ošetriť ochranným prostriedkom, sa ošetrí metódou uvedenou pre daný ochranný prostriedok. Môže to byť proces ošetrenia prienikom alebo proces povrchovej aplikácie, a to ponorením, postriekaním alebo nanesením kefou.

Ochranné prostriedky, ktoré sa majú aplikovať procesom ošetrenia prienikom

28. Pripraví sa taký roztok ochranného prostriedku, pomocou ktorého sa dosiahne špecifikovaná absorpcia alebo retencia pri použití procesu ošetrenia prienikom. Skúšobná vzorka dreva sa odváži a odmerajú sa jej rozmery. Proces ošetrenia prienikom by mal byť v súlade so špecifikáciou pre aplikovanie ochrannej látky na drevo používanou v rámci triedy použitia 4 alebo 5. Vzorka sa po ošetrení znova odváži a vypočíta sa retencia ochranného prostriedku (kg/m^3) z rovnice:

$$\frac{\text{hmotnosť po ošetrení (kg)} - \text{hmotnosť pred ošetrením (kg)}}{\text{objem skúšobnej vzorky (m}^3\text{)}} \times \frac{\text{koncentrácia roztoku (hmotnostné \%/ hmotnostné)}}{100}$$

29. V tomto teste možno použiť aj drevo ošetrené v zariadení na priemyselné ošetrenie (napr. vákuovo-tlakovou impregnáciou). Použité postupy by sa mali zaznamenať a musí sa analyzovať a zaznamenať retencia materiálu ošetreného týmto spôsobom.

Ochranné prostriedky, ktoré sa majú aplikovať procesmi povrchovej aplikácie

30. Proces povrchovej aplikácie zahŕňa ponáranie alebo postrekovanie skúšobných vzoriek dreva alebo nanášanie ochranného prostriedku kefou. Proces a miera aplikácie (napr. litre/m^2) by mali byť v súlade so špecifikáciou pre povrchovú aplikáciu ochranného prostriedku.

31. Aj v tomto prípade možno v tomto teste použiť drevo ošetrené v zariadení na priemyselné ošetrenie. Použité postupy by sa mali zaznamenať a musí sa analyzovať a zaznamenať retencia materiálu ošetreného týmto spôsobom.

Úprava skúšobných vzoriek po ošetrení

32. Po ošetrení sa ošetrené skúšobné vzorky majú upraviť v súlade s odporúčaniami dodávateľa testovaného ochranného prostriedku podľa požiadaviek na označení prostriedku alebo v súlade s postupmi komerčného ošetrenia alebo normou EN 252.

Príprava a výber skúšobných vzoriek

33. Po úprave po ošetrení sa vypočíta priemerná retencia skupiny testovaných vzoriek a na meranie lúhovania sa náhodne vyberú tri reprezentatívne súbory vzoriek s retenciou v rozmedzí 5 % priemeru pre skupinu.

POSTUP MERANÍ EMISIÍ OCHRANNÉHO PROSTRIEDKU

Metóda ponorenia

34. Skúšobné vzorky sa odvážia a následne úplne ponoria do vody, pričom sa zaznamená dátum a čas. Nádoba sa zakryje, aby sa znížilo odparovanie.

35. Voda sa vymieňa v týchto časových bodoch: 6 hodín, 1 deň, 2 dni, 4 dni, 8 dní, 15 dní, 22 dní, 29 dní (poznámka: sú to celkové časy, nie intervaly). Je potrebné zaznamenať čas a dátum výmeny vody a hmotnosť vody odobratej z nádoby.

36. Po každej výmene vody sa odloží vzorka vody, do ktorej bol ponorený súbor skúšobných vzoriek, na následnú chemickú analýzu.

37. Postup odberu vzoriek umožňuje výpočet profilu množstva emisií v čase. Vzorky by sa mali skladovať za podmienok, ktoré chránia analyt, napr. v chladničke a v tme, aby sa znížil rast mikróbov vo vzorke pred analýzou.

MERANIA EMISIÍ

Ošetrené vzorky

38. Odobratá voda sa podľa potreby chemicky analyzuje z hľadiska účinnej látky a/alebo relevantných produktov degradácie/transformácie.

Neošetrené vzorky

39. Odber vody (emisátu) v tomto systéme a následná analýza chemikálií, ktoré sa vylúhovali zo vzoriek neošetreného dreva, umožňujú odhadnúť možnú rýchlosť emisie ochranného prostriedku z neošetreného dreva. Odber a analýza emisátu po predĺžení časových intervalov expozície umožňujú odhadnúť mieru zmeny rýchlosti emisie v čase. Táto analýza je kontrolným postupom na určenie úrovne testovanej chemikálie v pozadí v neošetrenom dreve, ktorého účelom je potvrdiť, že drevo použité ako zdroj vzoriek nebolo predtým ošetrené ochranným prostriedkom.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Chemické analýzy

40. Odobratá voda sa chemicky analyzuje a výsledok analýzy vody sa vyjadrí vo vhodných jednotkách, napr. µg/l.

Hlásenie údajov

41. Všetky výsledky sa zaznamenajú. Dodatok obsahuje príklad navrhovaného formulára na záznam údajov o jednom súbore ošetrených skúšobných vzoriek, ako aj súhrnnú tabuľku na výpočet priemerných hodnôt emisií v každom intervale odberu vzoriek.

42. Denný tok emisií v mg/m^2/deň sa vypočíta ako priemer troch meraní z troch replikátov vydelený počtom dní ponorenia.

Protokol o skúške

43. Protokol o skúške má obsahovať aspoň tieto informácie:

— názov dodávateľa testovaného ochranného prostriedku,

— osobitný a jedinečný názov alebo kód testovaného ochranného prostriedku,

— obchodný alebo bežný názov účinnej zložky (účinných zložiek) so všeobecným opisom ďalších zložiek (napr. pomocného rozpúšťadla, živice) a zloženie v hmotnostných % zložiek,

— príslušná retencia alebo zaťaženie (v kg/m^3, resp. l/m^2) špecifikované pre použité drevo pri kontakte s vodou,

— druh použitého dreva a jeho hustota a rýchlosť rastu v letokruhoch na 10 mm,

— zaťaženie alebo retencia testovaného ochranného prostriedku a vzorec použitý na výpočet retencie, vyjadrené v l/m^2 alebo kg/m^3,

— metóda aplikácie ochranného prostriedku s uvedením harmonogramu ošetrovania použitého v procese prieniku a metóda aplikácie v prípade povrchového ošetrenia,

— dátum aplikácie ochranného prostriedku a odhad obsahu vlhkosti skúšobných vzoriek vyjadrený ako percento,

— použité postupy úpravy s uvedením typu, podmienok a trvania,

— špecifikácia koncovej tesniacej látky a počet aplikovaní,

— špecifikácia prípadného následného ošetrenia dreva, napr. špecifikácia dodávateľa, typu, vlastností a množstva náteru,

— čas a dátum každého ponorenia, množstvo vody použitej na ponorenie skúšobných vzoriek pri každom ponorení a množstvo vody absorbovanej drevom pri ponorení,

— akákoľvek odchýlka od opísanej metódy a všetky faktory, ktoré mohli mať vplyv na výsledky.

LITERATÚRA

1. Európska norma, EN 84 – 1997. Ochranné prostriedky na drevo. Urýchlené starnutie ošetreného dreva na biologické skúšky. Postup vyplavovaním.

2. Európska norma, EN 113/A1 – 2004. Ochranné prostriedky na drevo. Skúšobná metóda zisťovania ochrannej účinnosti proti drevokazným hubám *Basidiomycetes*. Zisťovanie hraníc účinnosti.

3. Európska norma, EN 252 – 1989. Postup skúšok na zisťovanie relatívnej účinnosti ochranného prostriedku na drevo v kontakte so zemou v prírodných podmienkach.

4. Európska norma, EN 335 – Part 1: 2006. Trvanlivosť dreva a výrobkov na báze dreva. Triedy používania: definície, časť 1: Všeobecné.

5. American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

6. American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

Dodatok 1

Formulár na záznam údajov z testovacej metódy

Odhad emisií z dreva ošetreného ochranným prostriedkom do životného prostredia: laboratórna metóda pre drevené komodity bez povrchovej úpravy, ktorésú v kontakte so sladkou vodou alebo morskou vodou

Testujúca inštitúcia	
Prostriedok na ochranu dreva	
Dodávateľ ochranného prostriedku	
Osobitný a jedinečný názov alebo kód ochranného prostriedku	
Obchodný alebo bežný názov ochranného prostriedku	
Ďalšie zložky	
Príslušná retencia použitého dreva pri kontakte s vodou	
Aplikácia	
Metóda aplikácie	
Dátum aplikácie	
Vzorec použitý na výpočet retencie:	
Postup úpravy	
Trvanie úpravy	
Koncová tesniaca látka/počet aplikovaní	
Následné ošetrenie	ak sa použije
Skúšobné vzorky	
Druh dreva	
Hustota dreva	(minimum … priemerná hodnota … maximum)
Rýchlosť rastu (letokruhy na 10 mm)	(minimum … priemerná hodnota … maximum)
Obsah vlhkosti	

Testovacie zostavy (*)	**Retencia (napr. kg/m³)**
Ošetrené ‚x'	Priemerná hodnota a štandardná odchýlka alebo rozsah pre päť vzoriek
Ošetrené ‚y'	Priemerná hodnota a štandardná odchýlka alebo rozsah pre päť vzoriek
Ošetrené ‚z'	Priemerná hodnota a štandardná odchýlka alebo rozsah pre päť vzoriek
Neošetrené	
Odchýlka od parametrov testovacej metódy	napr. kvalita vody, rozmery testovaných vzoriek atď.

(*) x, y, z predstavujú tri replikáty vzorky

Čas	Výmena vody	Hmotnosť vzorky		Absorpcia vody		Vzorka vody				
		Ošetrené (priemer)	Neošetrené	Ošetrené (priemer)	Neošetrené		Voda použitá na testovanie	x	y	z
	Dátum	g	g	g	g	č.	pH	pH	pH	pH
začiatok										
6 hod.						1				
24 hod.						2				
2 dni						3				
4 dni						4				
8 dní						5				
15 dní						6				
22 dní						7				
29 dní						8				

Pre každú účinnú zložku vytvorte samostatnú tabuľku.

Čas	Výmena vody	Výsledky analýzy														
		Neošetrené vzorky			Ošetrené vzorky											
		Koncentrácia úč. látky vo vode mg/l	Množstvo emisií mg/m2	Rýchlosť emisie mg/m2/d	Koncentrácia úč. látky vo vode				Množstvo emisií				Rýchlosť emisie			
					x	y	z	Priemer	x	y	z	Priemer	x	y	z	Priemer
	Dátum				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 hod.																
24 hod.																
2 dni																
4 dni																
8 dní																
15 dní																
22 dní																
29 dní																

Poznámka: Keďže na korekciu rýchlostí emisie z ošetrených vzoriek môže byť nutné použiť výsledky pre neošetrené vzorky, výsledky pre neošetrené vzorky by mali byť k dispozícii ako prvé a všetky hodnoty pre ošetrené vzorky budú ‚opravené hodnoty'. Môže sa vykonať aj korekcia počiatočnej analýzy vody.

Dodatok 2

Vymedzenie pojmov

Chemikália: látka alebo zmes.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

C.46. BIOAKUMULÁCIA PRI BENTICKÝCH MÁLOŠTETINAVCOCH ŽIJÚCICH V SEDIMENTE

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 2008. Endobentické živočíchy živiace sa sedimentom môžu byť vystavené látkam viazaným na sediment (1). Medzi týmito živočíchmi živiacimi sa sedimentom zohrávajú vodné máloštetinavce významnú úlohu na dnách vodných systémov. Žijú v sedimente a často sú najrozšírenejšími druhmi najmä na biotopoch s podmienkami životného prostredia, ktoré sú pre iné živočíchy nepriaznivé. Tieto živočíchy vzhľadom na bioturbáciu sedimentu a skutočnosť, že bývajú častou korisťou, môžu významne ovplyvňovať biodostupnosť týchto látok pre iné organizmy, napr. bentivorné ryby. Na rozdiel od epibentických organizmov sa endobentické vodné máloštetinavce zahrabávajú do sedimentu a živia sa časticami sedimentu pod jeho povrchom. Z tohto dôvodu sú tieto organizmy vystavené látkam prostredníctvom mnohých spôsobov absorpcie vrátane priameho kontaktu, požierania kontaminovaných častíc sedimentu, vody nachádzajúcej sa v póroch sedimentu a nadložnej vody. Niektoré druhy bentických máloštetinavcov, ktoré sa v súčasnosti využívajú v ekotoxikologickom testovaní, sú opísané v dodatku 6.

2. Medzi parametre, ktoré charakterizujú bioakumuláciu látky, patrí predovšetkým bioakumulačný faktor (BAF), konštanta vyjadrujúca rýchlosť sorpcie látok sedimentu (ks) a konštanta rýchlosti eliminácie (ke). Podrobné vymedzenie týchto parametrov je uvedené v dodatku 1.

3. Na vyhodnotenie bioakumulačného potenciálu látok vo všeobecnosti a na skúmanie bioakumulácie látok, ktoré majú tendenciu rozdeľovať sa do sedimentov a na ne, je potrebná testovacia metóda špecifická pre daný kompartment (1) (2) (3) (4).

4. Táto testovacia metóda je určená na hodnotenie bioakumulácie látok viazaných na sediment pri endobentických červoch máloštetinavcoch. Testovaná látka sa aplikuje do sedimentu. Použitím obohateného sedimentu sa simuluje kontaminovaný sediment.

5. Táto metóda je založená na existujúcich testovacích metódach stanovenia toxicity a bioakumulácie v sedimente (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Ďalšie užitočné dokumenty: diskusie a výsledky z medzinárodného seminára (11) a výsledok medzinárodného kruhového testu (12).

6. Táto skúška sa týka stabilných neutrálnych organických látok, ktoré majú tendenciu viazať sa na sediment. Pomocou tejto metódy možno merať aj bioakumuláciu stabilných organokovových zlúčenín, ktoré sa viažu na sediment (12). Nemožno ju použiť na kovy a iné stopové prvky (11) bez úpravy koncepcie testu s ohľadom na substrát a objemy vody a prípadne na veľkosť vzorky tkaniva.

PREDPOKLADY A INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

7. V súčasnosti existuje iba niekoľko dobre stanovených kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity (QSAR) v súvislosti s procesmi bioakumulácie (14). Najpoužívanejším vzťahom je korelácia medzi bioakumuláciou a biokoncentráciou stabilných organických látok a ich lipofilitou [vyjadrená ako logaritmus rozdeľovacej konštanty oktanol – voda (log K_{ow}), vymedzenie pojmu nájdete v dodatku 1], ktorá sa používa na opis rozdeľovania látky medzi vodu a ryby. Pomocou tohto vzťahu sa stanovili aj korelácie pre kompartment sedimentu (15) (16) (17) (18). Korelácia medzi hodnotami log K_{ow} a log BCF (logaritmus faktora biokoncentrácie) ako hlavný ukazovateľ QSAR môže byť užitočná na prvý predbežný odhad bioakumulačného potenciálu látok viazaných na sediment. Hodnota BAF však môže byť ovplyvnená obsahom lipidov v testovacom organizme a obsahom organického uhlíka v sedimente. Preto možno ako hlavný faktor bioakumulácie organických látok viazaných na sediment použiť aj rozdeľovaciu konštantu organický uhlík – voda (K_{oc}).

8. Tento test sa uplatňuje na:

— stabilné organické látky s hodnotami log K_{ow} medzi 3,0 a 6,0 (5) (19) a superlipofilné látky s hodnotou log K_{ow} vyššou ako 6,0 (5),

— látky patriace do triedy organických látok známych svojím bioakumulačným potenciálom v živých organizmoch, napr. povrchovo aktívne látky alebo vysoko adsorpčné látky (napr. vysoká hodnota K_{oc}).

9. Pred začiatkom štúdie je potrebné získať informácie o testovanej látke, napríklad o bezpečnostných preventívnych opatreniach, vhodných podmienkach skladovania a stabilite, ako aj o analytických metódach. Usmernenia na testovanie látok s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v odkazoch (20) a (21). Pred vykonaním testu bioakumulácie s vodnými máloštetinavcami musia byť známe tieto informácie o testovanej látke:

— bežný názov, chemický názov (podľa možnosti názov IUPAC), štruktúrny vzorec, registračné číslo CAS, čistota,

— rozpustnosť vo vode [testovacia metóda A.6 (22)],

— rozdeľovacia konštanta oktanol – voda, K_{ow} [testovacie metódy A.8, A.24 (22)],

— rozdeľovacia konštanta sediment – voda vyjadrený ako K_d alebo K_{oc} [testovacia metóda C.19 (22)],

— hydrolýza [testovacia metóda C.7 (22)],

— fototransformácia vo vode (23),

— tlak pary [testovacia metóda A.4 (22)],

— ľahká biodegradovateľnosť [testovacie metódy C.4 a C.29 (22)],

— povrchové napätie [testovacia metóda A.5 (22)],

— kritická koncentrácia micel (24).

Okrem toho sú dôležité aj tieto informácie – ak sú dostupné:

— biodegradácia vo vodnom prostredí [testovacie metódy C.24 a C.25 (22)],

— Henryho konštanta.

10. Rádioaktívne označené testované látky môžu uľahčiť analýzu vzoriek vody, sedimentu a biologických vzoriek a môžu sa použiť na stanovenie toho, či sa má vykonať identifikácia a kvantifikácia produktov degradácie. Metóda, ktorá je tu opísaná, bola validovaná v medzinárodnom kruhovom teste (12) pre látky označené uhlíkom ^{14}C. Ak sa merajú celkové rádioaktívne rezíduá, bioakumulačný faktor (BAF) je založený na východiskovej látke vrátane všetkých zachovaných produktov degradácie. Takisto je možné skombinovať štúdiu metabolizmu so štúdiou bioakumulácie prostredníctvom analýzy a kvantifikácie percenta východiskovej látky a produktov jej degradácie vo vzorkách odobratých na konci vychytávacej fázy alebo na vrcholovej úrovni bioakumulácie. V každom prípade sa odporúča, aby výpočet hodnoty BAF vychádzal z koncentrácie východiskovej látky v organizmoch, nielen z celkových rádioaktívnych rezíduí.

11. Okrem vlastností testovanej látky medzi ďalšie požadované informácie patrí toxicita pre druhy máloštetinavcov použité v teste, napríklad stredná letálna koncentrácia (LC_{50}) v čase potrebnom na vychytávaciu fázu, aby sa zabezpečilo, že zvolené koncentrácie expozície sú oveľa nižšie ako toxické úrovne. Prednostne by sa mali použiť hodnoty toxicity získané z dlhodobých štúdií o subletálnych sledovaných parametroch (EC_{50}), ak sú k dispozícii. Ak také údaje nie sú dostupné, užitočné informácie môže poskytnúť test akútnej toxicity za podmienok, ktoré sú identické s podmienkami testovania bioakumulácie, alebo údaje o toxicite pre iné náhradné druhy.

12. Musí byť k dispozícii vhodná analytická metóda známej správnosti, presnosti a citlivosti na kvantifikáciu látky v testovacích roztokoch, sedimente a biologickom materiáli, ako aj údaje o príprave a skladovaní vzoriek a karty bezpečnostných údajov o materiáli. Treba poznať aj analytické detekčné limity testovanej látky vo vode, v sedimente a v tkanivách červov. Ak sa použije rádioaktívne označená testovaná látka, je nutné poznať aj špecifickú rádioaktivitu (t. j. Bq mol^{-1}), polohu rádioaktívne označeného atómu a percento rádioaktivity spojenej s nečistotami. Špecifická rádioaktivita testovanej látky by mala byť čo najvyššia, aby bolo možné zistiť čo najnižšie testované koncentrácie (11).

13. Mali by byť k dispozícii informácie o charakteristikách použitého sedimentu [napr. pôvod sedimentu alebo jeho zložiek, pH a koncentrácia amoniaku vo vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu (terénne sedimenty), obsah organického uhlíka (TOC), rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a ílu) a percento suchej hmotnosti] (6).

PRINCÍP TESTU

14. Test sa skladá z dvoch fáz: vychytávacej fázy (expozícia) a fázy eliminácie (po expozícii). Počas vychytávacej fázy sa červy vystavia pôsobeniu sedimentu obohateného testovanou látkou s rekonštituovanou vodou navrchu, podľa potreby po dosiahnutí rovnovážneho stavu (11). Skupiny kontrolných červov sa chovajú v tých istých podmienkach bez testovanej látky.

15. Vo fáze eliminácie sa červy prenesú do systému sediment – voda, ktorý neobsahuje testovanú látku. Fáza eliminácie je nutná na získanie informácií o rýchlosti, ktorou testovacie organizmy vylučujú testovanú látku (19) (25). Fáza eliminácie je nutná vždy okrem prípadu, keď je absorpcia testovanej látky počas fázy expozície bezvýznamná (napr. neexistuje štatistický rozdiel medzi koncentráciou testovanej látky v teste a v kontrolných červoch). Ak sa v priebehu vychytávacej fázy nedosiahol ustálený stav, stanovenie kinetických parametrov – hodnoty BAF_k, rýchlostných konštánt vychytávania a eliminácie – možno vykonať pomocou výsledkov pre fázu eliminácie. Zmena koncentrácie testovanej látky v/na červoch sa monitoruje v priebehu oboch fáz testu.

16. Počas vychytávacej fázy sa vykonávajú merania, až kým hodnota BAF nedosiahne plató alebo ustálený stav. Vychytávacia fáza by štandardne mala trvať 28 dní. Z praktických skúseností vyplynulo, že pre viaceré stabilné neutrálne organické látky stačí na dosiahnutie ustáleného stavu 12-dňová až 14-dňová vychytávacia fáza (6) (8) (9).

17. Ak sa však ustálený stav nedosiahne do 28 dní, začne sa fáza eliminácie prenesením vystavených máloštetinavcov do nádob obsahujúcich rovnaké médium bez testovanej látky. Fáza eliminácie sa ukončí vtedy, keď sa dosiahne 10 % úroveň koncentrácie nameranej v červoch v 28. deň vychytávacej fázy, alebo po uplynutí maximálneho trvania desať dní. Úroveň rezíduí v červoch na konci fázy eliminácie sa do správy uvedie ako dodatočný sledovaný parameter, napr. ako neeliminované rezíduá (NER). Bioakumulačný faktor (BAF_{ss}) sa podľa možnosti vypočíta ako pomer koncentrácie v červoch (C_a) a v sedimente (C_s) v zrejmom ustálenom stave aj ako kinetický bioakumulačný faktor BAF_K ako pomer rýchlostnej konštanty vychytávania zo sedimentu (k_s) a rýchlostnej konštanty eliminácie (k_e) pri predpoklade kinetiky prvého rádu. Ak sa ustálený stav nedosiahne do 28 dní, hodnotu BAF_K vypočítajte z rýchlostných konštánt vychytávania a eliminácie. Výpočet nájdete v dodatku 2. Ak nie je možné použiť kinetiku prvého rádu, mali by sa použiť zložitejšie modely [dodatok 2 a odkaz (25)].

18. Ak sa ustálený stav nedosiahne do 28 dní, vychytávacia fáza sa prípadne môže predĺžiť, pričom skupiny vystavených červov – ak sú k dispozícii – sa podrobia ďalším meraniam, až kým sa nedosiahne ustálený stav. Súbežne sa však v 28. deň vychytávacej fázy musí začať aj fáza eliminácie.

19. Rýchlostná konštanta vychytávania, rýchlostná konštanta eliminácie (alebo konštanty, ak sa použili zložitejšie modely), kinetický bioakumulačný faktor (BAF_K) a podľa možnosti hranice spoľahlivosti každého z týchto parametrov sa vypočítajú pomocou počítačových modelových rovníc (modely nájdete v dodatku 2). Správnosť odhadu každého modelu možno stanoviť na základe korelačného koeficientu alebo koeficientu určenia (koeficienty blízke hodnote 1 znamenajú vysokú mieru správnosti odhadu).

20. Na zníženie variability výsledkov testu v prípade organických látok s vysokou lipofilitou by sa bioakumulačné faktory mali vyjadriť aj vo vzťahu k obsahu lipidov v testovacích organizmoch a k obsahu organického uhlíka (TOC) v sedimente (akumulačný faktor bioty k sedimentu alebo BSAF ako hodnota TOC sedimentu v kg vydelená obsahom lipidov v červoch v kg). Tento prístup je založený na skúsenostiach a teoretických koreláciách pre vodný kompartment, kde v prípade niektorých tried chemikálií existuje zrejmý vzťah medzi bioakumulačným potenciálom látky a jej lipofilitou, ktorý bol jasne stanovený pri rybách ako modelových organizmoch (14) (25) (27). Existuje tiež vzťah medzi obsahom lipidov v testovacích rybách a pozorovanou bioakumuláciou týchto látok. V prípade bentických organizmov sa zistili podobné korelácie (15) (16) (17) (18). Ak je k dispozícii dostatok tkaniva z červov, obsah lipidov v testovacích živočíchoch možno určiť na rovnakom biologickom materiáli, aký sa použil na určenie koncentrácie testovanej látky. Je však praktické aspoň na začiatku alebo – podľa možnosti – na konci vychytávacej fázy použiť aklimatizované kontrolné živočíchy na odmeranie obsahu lipidov, ktorý sa následne môže použiť na normalizáciu hodnôt BAF.

VALIDITA TESTU

21. Ak má byť test platný, musia platiť tieto podmienky:

— kumulatívna úmrtnosť červov (v kontrolných skupinách a skupinách s aplikovanou látkou) do konca testu by nemala prekročiť 20 % pôvodného počtu,

— okrem toho je potrebné preukázať, že červy sa zahrabávajú do sedimentu, aby sa dosiahla maximálna expozícia. Podrobnosti nájdete v bode 28.

OPIS METÓDY

Testovacie druhy

22. V teste možno použiť viaceré druhy vodných máloštetinavcov. Najčastejšie používané druhy sú uvedené v dodatku 6.

23. Testy toxicity (96 hod., len vo vode) by sa mali vykonávať v pravidelných intervaloch (napr. každý mesiac) s referenčnou toxickou látkou, ako je chlorid draselný (KCl) alebo síran meďnatý ($CuSO_4$), (1) na preukázanie zdravotného stavu testovacích živočíchov (1) (6). Ak sa referenčné testy toxicity nevykonávajú v pravidelných intervaloch, dávka organizmov, ktoré sa majú použiť v teste bioakumulácie zo sedimentu, by sa mala skontrolovať pomocou referenčnej toxickej látky. Užitočné informácie o stave živočíchov môže poskytnúť aj meranie obsahu lipidov.

Kultivácia testovacích organizmov

24. S cieľom získať dostatočný počet červov na vykonanie testov bioakumulácie sa červy môžu chovať v stálej jednodruhovej laboratórnej kultúre. Metódy laboratórnej kultivácie pre zvolené testovacie druhy sú zhrnuté v dodatku 6. Podrobnosti nájdete v odkazoch (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

Prístroje

25. V prípade všetkých častí zariadenia treba dbať na to, aby sa predišlo používaniu materiálov, ktoré sa môžu rozpustiť, absorbovať testované látky alebo vylúhovať iné látky a ktoré majú škodlivé účinky na testovacie živočíchy. Možno použiť štandardné komory pravouhlého alebo valcovitého tvaru vyrobené z chemicky inertného materiálu a s primeranou kapacitou, ktoré zodpovedajú veľkosti násady, t. j. počtu testovacích červov. Treba sa vyhnúť použitiu rúrok z mäkkých plastov na aplikovanie vody alebo vzduchu. Všetky zariadenia, ktoré prichádzajú do kontaktu s testovacími médiami, by mali byť vyrobené z polytetrafluóretylénu, nehrdzavejúcej ocele alebo skla. V prípade látok s vysokým adsorpčným koeficientom, ako sú syntetické pyretroidy, môže byť potrebné silanizované sklo. V týchto prípadoch je potrebné zariadenia po použití zlikvidovať (5). V prípade rádioaktívne označených testovaných látok a prchavých látok sa treba vyhnúť stripovaniu a úniku stripovanej testovanej látky. Na zachytenie všetkých rezíduí odparených zo skúšobných komôr by sa mali použiť zachytávače (napr. sklenené fľaše na premývanie plynu) obsahujúce vhodné absorbenty.

Voda

26. Nadložná voda musí mať takú kvalitu, aby umožnila prežitie testovaného druhu počas celého obdobia aklimatizácie a testovania bez toho, aby sa prejavil nezvyčajný vzhľad alebo správanie. V testoch i laboratórnych kultúrach červov sa ako nadložnú vodu odporúča použiť rekonštituovanú vodu podľa testovacej metódy C.1 (25). Preukázalo sa, že v tejto vode môžu prežiť, rásť a rozmnožovať sa viaceré testovacie druhy (8), pričom je zabezpečená maximálna štandardizácia podmienok testu a kultivácie. Vodu je potrebné charakterizovať aspoň z hľadiska pH, vodivosti a tvrdosti. Užitočné informácie môže pred použitím poskytnúť analýza vody z hľadiska znečisťujúcich mikrolátok (dodatok 4).

27. Voda musí mať počas celého trvania testu stálu kvalitu. Hodnota pH nadložnej vody by mala byť medzi 6 a 9. Celková tvrdosť by na začiatku testu mala byť medzi 90 a 400 mg $CaCO_3$ na liter (7). Rozsahy pH a tvrdosti uvedenej rekonštituovanej vody sú uvedené v testovacej metóde C.1 (25). Ak existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou látkou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou. V dodatku 4 sú zhrnuté ďalšie kritériá prijateľnej riediacej vody podľa usmernenia OECD TG 210 (34).

Sediment

28. Sediment musí mať takú kvalitu, aby umožnila prežitie a podľa možnosti rozmnožovanie testovacích organizmov počas celého obdobia aklimatizácie a testovania bez toho, aby sa prejavil nezvyčajný vzhľad alebo správanie organizmov. Červy by sa mali zahrabávať do sedimentu. Zahrabávanie môže mať vplyv na expozíciu a následne aj na hodnotu BAF. Preto ak to zakalenie nadložnej vody umožňuje, malo by sa zaznamenať vyhýbanie sedimentu alebo zahrabávanie testovacích organizmov. Červy (v kontrolných skupinách i v skupinách s aplikovanou látkou) by sa mali zahrabať do sedimentu do 24 hodín od pridania do testovacích nádob. Ak sa pozoruje trvalé nezahrabávanie sa alebo vyhýbanie sa sedimentu (napr. viac ako 20 % v priebehu vyše polovicevychytávacej fázy), znamená to, že buď podmienky testovania nie sú vhodné, že testovacie organizmy nie sú zdravé alebo že toto správanie spôsobuje koncentrácia testovanej látky. V takom prípade je potrebné test zastaviť a zopakovať ho za upravených podmienok. Ďalšie informácie o požieraní sedimentu možno získať použitím metód opísaných v odkazoch (35) (36), ktorými sa stanovuje požieranie sedimentu alebo výber častíc pri testovacích organizmoch. Ak to je možné, je potrebné zaznamenať aspoň prítomnosť alebo neprítomnosť fekálnych peliet na povrchu sedimentu, ktoré poukazujú na požieranie sedimentu červami. Tieto informácie je nutné zohľadniť pri interpretácii výsledkov testu, pokiaľ ide o spôsoby expozície.

29. V teste aj laboratórnych kultúrach červov (dodatok 5) sa odporúča použiť umelý sediment založený na umelo pripravenej pôde opísanej v testovacej metóde C.8 (40), lebo prírodné sedimenty dostatočnej kvality nemusia byť k dispozícii po celý rok. Test okrem toho môžu ovplyvniť aj pôvodné organizmy, ako aj možná prítomnosť znečisťujúcich mikrolátok v prírodných sedimentoch. V umelom sedimente môžu prežiť, rásť a rozmnožovať sa viaceré testovacie druhy (8).

30. Umelý sediment je nutné charakterizovať aspoň z hľadiska pôvodu zložiek, rozdelenia veľkosti častíc (percento piesku, siltu a ílu), obsahu organického uhlíka (TOC), obsahu vody a pH. Meranie oxidačno-redukčného potenciálu je voliteľné. Ako testovací a/alebo kultivačný sediment sa však môže použiť prírodný sediment z neznečistených miest (1). Prírodné sedimenty je nutné charakterizovať aspoň z hľadiska pôvodu (miesta odberu), pH a obsahu amoniaku vo vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu, obsahu organického uhlíka (TOC), rozdelenia veľkosti častíc (percento piesku, siltu a ílu) a percentuálneho obsahu vody (6). Ak sa očakáva tvorba amoniaku, odporúča sa, aby sa prírodný sediment pred aplikovaním testovanej látky uviedol na sedem dní do podmienok, ktoré sa použijú v nasledujúcom teste. Na konci obdobia uvádzania do podmienok je nutné odstrániť a zlikvidovať nadložnú vodu. Analýzou sedimentu alebo jeho zložiek pred použitím možno získať užitočné informácie o znečisťujúcich mikrolátkach.

Príprava

31. Manipulácia s prírodnými sedimentmi pred použitím v laboratóriu je opísaná v (1) (6) (44). Príprava umelého sedimentu je opísaná v dodatku 5.

Skladovanie

32. Skladovanie prírodných sedimentov v laboratóriu by malo byť čo najkratšie. U.S. EPA (6) odporúča maximálnu dĺžku skladovania osem týždňov pri teplote 4 °C ± 2 °C v tme. V skladovacích nádobách by nad sedimentom nemal byť žiadny uzavretý priestor. Odporúčania na skladovanie umelého sedimentu sú uvedené v dodatku 5.

Aplikácia testovanej látky

33. Sediment sa obohatí testovanou látkou. Postup obohacovania zahŕňa nanesenie testovanej chemikálie na jednu alebo viacero zložiek sedimentu. Napríklad kremenný piesok alebo jeho časť (napr. 10 g kremenného piesku na testovaciu nádobu) možno napustiť roztokom testovanej látky vo vhodnom rozpúšťadle, ktoré sa následne pomaly odparí do sucha. Časť s nánosom možno potom zamiešať do mokrého sedimentu. Pri príprave sedimentu je nutné zohľadniť množstvo piesku, ktorý pochádza zo zmesi testovanej látky a piesku, čiže sediment by sa mal pripraviť s menším množstvom piesku (6).

34. Ak sa použije prírodný sediment, testovanú látku možno pridať obohatením vysušenej časti sedimentu podľa opisu pre umelý sediment alebo primiešaním testovanej látky do mokrého sedimentu s následným odparením prípadne použitého solubilizačného prostriedku. Medzi vhodné rozpúšťadlá, ktoré možno použiť na obohatenie mokrého sedimentu, patrí etanol, metanol, etylénglykolmonometyléter, etylénglykoldimetyléter, dimetylformamid a trietylénglykol (5) (34). Hlavnými kritériami pri výbere vhodného solubilizačného prostriedku by mali byť toxicita a prchavosť rozpúšťadla a rozpustnosť testovanej látky vo vybratom rozpúšťadle. Ďalšie usmernenia o postupoch obohacovania obsahuje Environment Canada (1995) (41). Je nutné zabezpečiť, aby sa testovaná látka pridávaná do sedimentu v sedimente dôkladne a rovnomerne distribuovala. Mali by sa analyzovať replikované podvzorky obohateného sedimentu, aby sa skontrolovali koncentrácie testovanej látky v sedimente a aby sa stanovila úroveň homogenity distribúcie testovanej látky.

35. Keď je obohatený sediment s nadložnou vodou pripravený, je vhodné umožniť rozdelenie testovanej chemikálie medzi sediment a vodnú fázu. To by sa podľa možnosti malo vykonať za rovnakých teplotných a prevzdušňovacích podmienok aké sa použijú v teste. Primeraný čas dosahovania rovnováhy závisí od konkrétneho sedimentu a látky a môže trvať niekoľko hodín až dní a v zriedkavých prípadoch až niekoľko týždňov (štyri až päť týždňov) (28) (42). V tomto teste sa neočakáva dosiahnutie rovnovážneho stavu, ale odporúča sa obdobie dosahovania rovnováhy v trvaní 48 hodín až sedem dní. V závislosti od účelu štúdie, napr. ak sa napodobňujú podmienky životného prostredia, sa obohatený sediment môže nechať dosahovať rovnováhu alebo zrieť dlhšie (11).

VYKONANIE TESTU

Predbežná skúška

36. V záujme optimalizácie podmienok hlavného testovania môže byť užitočné vykonať predbežný experiment zameraný napríklad na voľbu koncentrácie/koncentrácií testovanej látky a trvanie vychytávacej fázy a fázy eliminácie. Počas predbežnej skúšky sa pozoruje a zaznamenáva správanie červov, napríklad vyhýbanie sa sedimentu, teda únik červov zo sedimentu, ktoré môže byť spôsobené testovanou látkou a/alebo samotným sedimentom. Vyhýbanie sa sedimentu sa v predbežnej skúške môže použiť aj ako subletálny parameter na odhad koncentrácií testovanej látky, ktoré sa majú použiť v teste bioakumulácie.

Podmienky expozície

Trvanie vychytávacej fázy

37. Testovacie organizmy sa počas vychytávacej fázy vystavia pôsobeniu testovanej látky. Prvá vzorka sa odoberie po 4 až 24 hodinách od začiatku vychytávacej fázy. Okrem prípadov, v ktorých sa dosiahne rovnováha preukázateľne skôr, by vychytávacia fáza mala trvať maximálne 28 dní (1) (6) (11). Ustálený stav nastáva vtedy, keď: i) je krivka závislosti bioakumulačných faktorov v jednotlivých časoch odberu vzoriek od času rovnobežná s časovou osou, ii) tri po sebe nasledujúce analýzy hodnôt BAF vzoriek odobratých v intervaloch najmenej dvoch dní sa navzájom nelíšia o viac ako ± 20 % a iii) neexistujú významné rozdiely medzi tromi časmi odberu vzoriek (na základe štatistických porovnaní, napr. analýzy rozptylu a regresnej analýzy). Ak sa rovnovážny stav nedosiahne do 28 dní, vychytávaciu fázu možno ukončiť začatím fázy eliminácie a hodnotu BAF_K možno vypočítať z rýchlostných konštánt vychytávania a eliminácie (pozri tiež body 16 až 18).

Trvanie fázy eliminácie

38. Prvá vzorka sa odoberie po 4 až 24 hodinách od začiatku fázy eliminácie, lebo v úvodnom období môže dôjsť k náhlym zmenám v rezíduu tkaniva. Fázu eliminácie sa odporúča ukončiť buď vtedy, keď je koncentrácia testovanej látky nižšia ako 10 % koncentrácie v ustálenom stave, alebo maximálne po desiatich dňoch. Úroveň rezíduí v červoch na konci fázy eliminácie sa do správy uvedie ako sekundárny sledovaný parameter. Toto obdobie však možno stanoviť ako obdobie, počas ktorého je koncentrácia testovanej látky v červoch vyššia ako analytický detekčný limit.

Testovacie organizmy

Počet testovacích červov

39. Počet červov na vzorku musí predstavovať takú hmotnosť tkaniva červov, aby bola hmotnosť testovanej látky na vzorku na začiatku vychytávacej fázy, resp. na konci fázy eliminácie výrazne vyššia ako detekčný limit testovanej látky v biologickom materiáli. V uvedených štádiách vychytávacej fázy a fázy eliminácie je koncentrácia v testovacích živočíchoch zvyčajne pomerne nízka (6) (8) (18). Keďže individuálna hmotnosť mnohých druhov vodných máloštetinavcov je veľmi nízka (5 – 10 mg mokrej hmotnosti na jedinca v prípade *Lumbriculus variegatus* a *Tubifex tubifex*), červy z daného replikátu skúšobnej komory sa môžu na účely váženia a analýzy testovanej chemikálie spojiť. V prípade testovacích druhov s vyššou individuálnou hmotnosťou (napr. *Branchiura sowerbyi*) možno použiť replikáty obsahujúce jedného jedinca, ale v týchto prípadoch by sa počet replikátov mal zvýšiť na päť na bod odberu vzoriek (11). Treba však poznamenať, že druh *B. sowerbyi* nebol zahrnutý do kruhového testu (12), a preto sa neodporúča ako vhodný druh pre túto metódu.

40. Mali by sa použiť červy podobnej veľkosti (informácie o druhu *L. variegatus* nájdete v dodatku 6). Mali by pochádzať z toho istého zdroja a malo by ísť o dospelých jedincov alebo veľké živočíchy tej istej vekovej triedy (pozri dodatok 6). Hmotnosť a vek živočícha môžu mať významný vplyv na hodnoty BAF (napr. v dôsledku rôzneho obsahu lipidov a/alebo prítomnosti vajíčok). Tieto parametre je potrebné presne zaznamenať. Na účely merania priemernej mokrej a suchej hmotnosti sa pred začatím testu odváži podvzorka červov.

41. Očakáva sa, že červy druhov *Tubifex tubifex* a *Lumbriculus variegatus* sa počas trvania testu budú rozmnožovať. Neprítomnosť rozmnožovania v teste bioakumulácie by sa mala zaznamenať a vziať do úvahy pri interpretácii výsledkov testu.

Násada

42. Mali by sa použiť vysoké pomery sedimentu k červom a vody k červom, aby sa minimalizovalo znižovanie koncentrácie testovanej látky v sedimente počas vychytávacej fázy a aby sa predišlo poklesu koncentrácie rozpusteného kyslíka. Zvolený stupeň zaťaženia by takisto mal zodpovedať prirodzene sa vyskytujúcim hustotám populácie vybratého druhu (43). Napríklad v prípade druhu *Tubifex tubifex* sa odporúča stupeň zaťaženia 1 – 4 mg tkaniva červov (mokrá hmotnosť) na gram mokrého sedimentu (8) (11). V odkazoch (1) a (6) sa pre druh *L. variegatus* odporúča stupeň zaťaženia ≤ 1 g suchej hmotnosti tkaniva červov na 50 g organického uhlíka v sedimente.

43. Červy, ktoré sa použijú v teste, sa odoberú z kultúry preosiatím kultivačného sedimentu. Živočíchy (dospelé alebo veľké červy bez známok nedávnej fragmentácie) sa prenesú do sklenených misiek (napr. Petriho misiek) obsahujúcich čistú vodu. Ak sa podmienky testovania líšia od podmienok kultivácie, mala by stačiť fáza aklimatizácie v trvaní 24 hodín. Pred vážením sa má z červov odstrániť nadbytočná voda. Na tieto účely možno červy opatrne uložiť na navlhčenú papierovú servítku. Neodporúča sa na sušenie červov používať absorpčný papier, lebo im to môže spôsobiť stres alebo poškodenie. Brunson et al. (1998) odporučili použiť nevytreté červy s hmotnosťou približne 1,33-násobku cieľovej biomasy. Týchto dodatočných 33 % zodpovedá rozdielu medzi vytretými a nevytretými červami (28).

44. Na začiatku vychytávacej fázy (0. deň testu) sa testovacie organizmy vyberú z aklimatizačnej komory a náhodne rozdelia do nádob (napr. Petriho misiek) obsahujúcich rekonštituovanú vodu, a to tak, že skupiny dvoch červov sa pridávajú do jednotlivých nádob, kým každá nádoba neobsahuje desať červov. Každá z týchto skupín červov sa potom náhodne prenesie do samostatných testovacích nádob, napr. pomocou jemnej oceľovej pinzety. Testovacie nádoby sa potom inkubujú za testovacích podmienok.

Kŕmenie

45. Vzhľadom na nízky obsah živín v umelom sedimente by sa do sedimentu mal pridať zdroj potravy. S cieľom vyhnúť sa podhodnoteniu expozície testovacích organizmov, napr. selektívnym kŕmením nekontaminovanou potravou, by sa potrava potrebná na rozmnožovanie a rast testovacích organizmov mala do sedimentu pridať len raz pred aplikáciou testovanej látky alebo počas nej (pozri dodatok 5).

Pomer sediment – voda

46. Odporúčaný pomer sediment – voda je 1: 4 (45). Tento pomer sa považuje za vhodný na udržanie koncentrácie kyslíka na vhodnej úrovni a na zabránenie hromadeniu amoniaku v nadložnej vode. Obsah kyslíka v nadložnej vode by sa mal udržiavať na ≥ 40 % saturácie. Nadložná voda v testovacích nádobách by sa mala jemne prevzdušňovať (napr. dve až štyri bubliny za sekundu) pomocou Pasteurovej pipety umiestnenej približne 2 cm nad povrchom sedimentu, aby sa minimalizovalo narušenie sedimentu.

Svetlo a teplota

47. Fotoperióda v kultúre a v teste je 16 hodín (1) (6). Intenzita svetla v testovacom priestore by sa mala udržiavať približne na 500 – 1 000 lx. Teplota by počas celého testu mala byť 20 ± 2 °C.

Testované koncentrácie

48. Na stanovenie kinetiky vychytávania sa používa jedna testovaná koncentrácia (čo najnižšia), ale možno použiť aj druhú (vyššiu) koncentráciu [napr. (46)]. V takom prípade sa vzorky odoberajú a analyzujú v ustálenom stave alebo po 28 dňoch s cieľom potvrdiť nameranú hodnotu BAF pri nižšej koncentrácii (11). Vyššia koncentrácia by sa mala zvoliť tak, aby sa vylúčili nepriaznivé účinky (napr. výberom približne 1 % koncentrácie spôsobujúcej najnižší známy chronický účinok EC_x získanej z príslušných štúdií chronickej toxicity). Nižšia testovaná koncentrácia by mala byť výrazne vyššia ako detekčný limit v sedimente a biologických vzorkách pre použitú analytickú metódu. Ak je účinná koncentrácia testovanej látky blízko analytickému detekčnému limitu, odporúča sa použiť rádioaktívne označenú testovanú látku s vysokou špecifickou rádioaktivitou.

Replikáty s aplikovanou chemikáliou a kontrolné replikáty

49. Minimálny počet replikátov s aplikovanou chemikáliou na meranie kinetických vlastností by mal byť tri na bod odberu vzorky (11) počas vychytávacej fázy a fázy eliminácie. Ďalšie replikáty sa majú použiť napr. pre voliteľné dodatočné dni odberu vzoriek. Vo fáze eliminácie sa pripraví zodpovedajúci počet replikátov s neobohateným sedimentom a nadložnou vodou tak, aby bolo možné na konci vychytávacej fázy preniesť červy s aplikovanou chemikáliou z určených nádob s aplikovanou látkou do nádob bez aplikovanej látky. Celkový počet replikátov s aplikovanou látkou by mal byť dostatočný na vychytávaciu fázu i fázu eliminácie.

50. Alternatívne sa červy určené na odber vzoriek počas fázy eliminácie môžu exponovať v jednej veľkej nádobe obsahujúcej obohatený sediment z tej istej dávky, aká sa použila na stanovenie kinetiky vychytávania. Je potrebné preukázať, že testovacie podmienky (napr. hĺbka sedimentu, pomer sediment – voda, násada, teplota, kvalita vody) sú porovnateľné s replikátmi určenými na vychytávaciu fázu. Na konci vychytávacej fázy sa z tejto nádoby majú odobrať vzorky vody, sedimentu a červov na analýzu a dostatočný počet veľkých červov, ktoré nejavia žiadne známky nedávnej fragmentácie, opatrne sa vyberú a premiestnia do replikátov pripravených na fázu eliminácie (napr. desať organizmov na replikačnú nádobu).

51. Ak sa nepoužije iné rozpúšťadlo ako voda, malo by sa použiť aspoň deväť replikátov negatívnej kontrolnej skupiny (aspoň tri vzorky na začiatku, tri na konci vychytávania a tri na konci eliminácie) na biologickú analýzu a analýzu pozadia. Ak sa na aplikáciu testovanej látky použije solubilizačný prostriedok, je potrebné vykonať analýzu kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom (vzorky aspoň z troch replikátov na začiatku, troch na konci fázy vychytávania a troch na konci fázy eliminácie). V tomto prípade je na odber vzoriek na konci vychytávacej fázy potrebné použiť aspoň štyri replikáty negatívnej kontrolnej skupiny (bez rozpúšťadla). Tieto replikáty možno biologicky porovnať s kontrolnou vzorkou s rozpúšťadlom s cieľom získať informácie o možnom vplyve rozpúšťadla na testovacie organizmy. Podrobnosti sú uvedené v dodatku 3.

Frekvencia meraní kvality vody

52. Počas vychytávacej fázy a fázy eliminácie by sa v nadložnej vode mali merať minimálne tieto parametre kvality vody:

Teplota	v jednej nádobe pre každú koncentráciu aplikovanej látky na deň odberu vzoriek a v jednej kontrolnej nádobe raz týždenne a na začiatku a na konci vychytávacej fázy a fázy eliminácie; možno zaznamenávať aj teplotu v okolitom médiu (okolitý vzduch alebo vodný kúpeľ) alebo v jednej reprezentatívnej testovacej nádobe, napr. nepretržite alebo v hodinových intervaloch,
Obsah rozpusteného kyslíka	v jednej nádobe pre každú koncentráciu aplikovanej látky a v jednej kontrolnej nádobe na deň odberu vzoriek, vyjadrený ako mg/l a % ASV (rozpustnosť vzdušného kyslíka),
Prívod vzduchu	kontrolovaný aspoň raz za deň (pracovné dni) a upravený podľa potreby,
pH	v jednej nádobe pre každú koncentráciu aplikovanej látky na deň odberu vzoriek a v jednej kontrolnej nádobe raz týždenne a na začiatku a na konci vychytávacej fázy a fázy eliminácie,
Celková tvrdosť vody	aspoň v jednej nádobe s aplikovanou látkou a v jednej kontrolnej testovacej nádobe na začiatku a na konci vychytávacej fázy a fázy eliminácie, vyjadrená ako mg/l $CaCO_3$,
Celkový obsah amoniaku	aspoň v jednej nádobe s aplikovanou látkou a v jednej kontrolnej testovacej nádobe na začiatku a na konci vychytávacej fázy a fázy eliminácie, vyjadrený ako mg/l NH_4^+ alebo NH_3, alebo celkový amoniak –N.

Odber vzoriek a analýza červov, sedimentu a vody

Časový harmonogram odberov vzoriek

53. Príklady harmonogramu odberov vzoriek v prípade 28-dňovej vychytávacej fázy a 10-dňovej fázy eliminácie sú uvedené v dodatku 3.

54. Odoberte vzorky vody a sedimentu zo skúšobných komôr na účely stanovenia koncentrácie testovanej látky pred pridaním červov a počas vychytávacej fázy i fázy eliminácie. V priebehu testu sa stanovia koncentrácie testovanej látky v červoch, sedimente a vode s cieľom monitorovať distribúciu testovanej látky do kompartmentov testovacieho systému.

55. Vzorky červov, sedimentu a vody odoberte aspoň šesťkrát v priebehu vychytávacej fázy i fázy eliminácie.

56. Pokračujte v odbere vzoriek, kým sa nedosiahne plató (ustálený stav) (pozri dodatok 1), alebo počas 28 dní. Ak sa plató nedosiahne do 28 dní, začnite fázu eliminácie. Na začiatku fázy eliminácie preneste určené červy do replikačných komôr obsahujúcich neobohatený sediment a vodu (pozri aj body 17 a 18).

Odber a príprava vzoriek

57. Získajte vzorky dekantáciou, odsaním alebo pipetovaním objemu dostatočného na odmeranie množstva testovanej látky vo vzorke.

58. Zvyšná nadložná voda sa opatrne dekantuje alebo odsaje z testovacej komory (testovacích komôr). Vzorky sedimentu by sa mali odoberať opatrne, aby sa červy čo najmenej rušili.

59. V čase odberu vzoriek vyberte všetky červy z testovaného replikátu, napr. tak, že suspendujete sediment s nadložnou vodou a rozotriete obsah každého replikátu na plytkú misku. Červy z nej potom vyberte jemnou oceľovou pinzetou. Rýchlo ich prepláchnite vodou v plytkom pohári alebo na oceľovej miske. Odstráňte prebytočnú vodu. Červy opatrne preneste do vopred odváženej nádoby a odvážte ich. Usmrťte červy zmrazením (napr. ≤ –18 °C). Zaznamenajte prítomnosť a množstvo zámotkov a/alebo mladých jedincov.

60. Vo všeobecnosti sa červy majú odvážiť a usmrtiť ihneď po odbere vzorky bez fázy vyprázdnenia čriev, aby sa získala konzervatívna hodnota BAF, ktorá zahŕňa kontaminovaný obsah čriev, a aby sa zabránilo strate telesných rezíduí počas obdobia vyprázdňovania čriev len vo vode (8). Očakáva sa, že látky s hodnotami log K_{ow} vyššími ako 5 sa nebudú výrazne eliminovať v prípadnom období vyprázdňovania čriev len vo vode, kým látky s hodnotou log K_{ow} nižšou ako 4 sa môžu eliminovať v značnom množstve (47).

61. Vo fáze eliminácie červy vyprázdňujú črevá do čistého sedimentu. To znamená, že merania bezprostredne pred fázou eliminácie zahŕňajú sediment s kontaminovaným obsahom čriev, zatiaľ čo pri meraniach po prvých 4 – 24 hodinách fázy eliminácie sa predpokladá, že väčšina kontaminovaného obsahu čriev sa nahradí čistým sedimentom (11) (47). Koncentrácia v červoch z tejto vzorky sa potom môže považovať za koncentráciu v tkanive po vyprázdnení čriev. Na zohľadnenie zriedenia koncentrácie testovanej látky nekontaminovaným sedimentom počas fázy eliminácie možno hmotnosť obsahu čriev odhadnúť na základe pomeru mokrej hmotnosti a hmotnosti popola alebo pomeru suchej hmotnosti a hmotnosti popola červov.

62. Ak je účelom osobitnej štúdie merať biodostupnosť a skutočné tkanivové rezíduá v testovacích organizmoch, potom sa aspoň podvzorka živočíchov s aplikovanou látkou (napr. z ďalších troch replikačných nádob), ktorá sa podľa možnosti odobrala v ustálenom stave, má odvážiť, nechať vyprázdňovať v čistej vode počas 6 hodín (47) a pred analýzou znova odvážiť. Údaje o hmotnosti červov a telesnej koncentrácii v tejto podvzorke možno potom porovnať s hodnotami získanými z nevyprázdnených červov. Červy určené na meranie eliminácie by sa pred prenosom do čistého sedimentu nemali vyprázdniť, aby sa minimalizoval ďalší stres živočíchov.

63. Vzorky vody, sedimentu a červov by sa podľa možnosti mali analyzovať ihneď (t. j. do jedného až dvoch dní) po odobratí, aby sa predišlo degradácii alebo iným stratám a aby bolo možné vypočítať približnú rýchlosť vychytávania a eliminácie v priebehu testu. Okamžitou analýzou sa tiež predíde oddialeniu stanovenia dosiahnutia plató.

64. Ak sa analýza nevykoná ihneď, vzorky by sa mali skladovať za primeraných podmienok. Pred začiatkom štúdie získajte informácie o stabilite a vhodných podmienkach skladovania danej testovanej látky (napr. o trvaní a teplote skladovania, postupoch extrakcie atď.). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii a považujú sa za potrebné, na stanovenie stability počas skladovania možno súbežne analyzovať obohatené kontrolné tkanivá.

Kvalita analytickej metódy

65. Celý postup v zásade závisí od správnosti, presnosti a citlivosti metódy použitej na analýzu testovanej látky. Treba preto experimentálne overiť, či sú presnosť a reprodukovateľnosť chemickej analýzy, ako aj výťažok testovanej látky zo vzoriek vody, sedimentu a červov pre danú metódu uspokojivé. Takisto je potrebné overiť, či testovaná látka nie je zistiteľná v kontrolných komorách vo vyšších koncentráciách ako v pozadí. Ak je to potrebné, opravte hodnoty C_w, C_s a C_a podľa hodnôt výťažku a hodnôt v pozadí pre kontrolné vzorky. So všetkými vzorkami počas celého testu zaobchádzajte tak, aby sa minimalizovala kontaminácia a strata (napr. v dôsledku adsorpcie testovanej látky na zariadenie na odber vzoriek).

66. Je potrebné zaznamenať a uviesť do správy celkový výťažok a výťažok testovanej látky v červoch, sedimente a vo vode, ako aj v zachytávačoch obsahujúcich absorbenty na zadržanie odparenej testovanej látky, ak sa použijú.

67. Keďže sa odporúča použiť rádioaktívne označené látky, je možné analyzovať celkovú rádioaktivitu (t. j. východiskovej látky a produktov degradácie). Ak to je však analyticky uskutočniteľné, dôležité informácie možno získať kvantifikáciou východiskovej testovanej látky a produktov degradácie v ustálenom stave alebo na konci vychytávacej fázy. Ak sa majú vykonať tieto merania, vzorky sa podrobia vhodným extrakčným postupom, aby bolo možné samostatne kvantifikovať východiskovú látku. Ak zistený produkt degradácie predstavuje významné percento (napr. > 10 %) rádioaktivity nameranej v testovacích organizmoch v ustálenom stave alebo na konci vychytávacej fázy, odporúča sa identifikovať tieto produkty degradácie (5).

68. V dôsledku nízkej individuálnej biomasy často nie je možné stanoviť koncentráciu testovanej látky v jednotlivých červoch okrem prípadu, keď sa ako testovací druh použije *Branchiura sowerbyi* (40 – 50 mg mokrej hmotnosti na červa) (11). Spájanie jedincov odobratých z danej testovacej nádoby je preto prípustné, ale obmedzujú sa tým štatistické postupy, ktoré možno použiť pri spracúvaní výsledkov. Ak sa má použiť konkrétny štatistický postup a spoľahlivosť, v teste sa musí použiť vhodný počet testovacích živočíchov a/alebo replikačných testovacích komôr, ktorý umožňuje želané spájanie vzoriek, postup a spoľahlivosť.

69. Odporúča sa vyjadriť hodnotu BAF ako funkciu celkovej mokrej hmotnosti i celkovej suchej hmotnosti a v prípade potreby (napr. v prípade vysoko lipofilných látok) aj ako funkciu obsahu lipidov a hodnoty TOC sedimentu. Na stanovenie obsahu lipidov sa majú použiť vhodné metódy (48) (49). Ako štandardnú metódu (48) možno odporúčať extrakciu chloroformom/metanolom (50). S cieľom vyhnúť sa použitiu chlórovaných rozpúšťadiel by sa mala použiť upravená metóda podľa Bligha a Dyera (50) opísaná v literatúre (51), ktorá sa otestovala v kruhovom teste. Keďže rôznymi metódami sa nedospeje k rovnakým hodnotám (48), je dôležité uviesť podrobné informácie o použitej metóde. Ak je to možné, t. j. ak je k dispozícii dostatočné množstvo tkaniva z červov, obsah lipidov sa odmeria na rovnakej vzorke alebo extrakte, aké sa použili na analýzu testovanej látky, lebo pred chromatografickou analýzou je často nutné lipidy z extraktu odstrániť (5). Je však praktické aspoň na začiatku alebo – podľa možnosti – na konci vychytávacej fázy použiť na meranie obsahu lipidov aklimatizované kontrolné živočíchy, napr. v troch vzorkách.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

70. Krivka vychytávania testovanej látky sa získa tak, že sa na aritmetickej osi zakreslí jej koncentrácia v/na červoch počas vychytávacej fázy v závislosti od času. Ak krivka dosiahne plató, vypočítajte hodnotu BAF_{ss} v ustálenom stave:

$$\frac{C_a \text{ v ustálenom stave alebo v 28. deň (priemerná)}}{C_s \text{ v ustálenom stave alebo v 28. deň (priemerná)}}$$

71. Stanovte kinetický bioakumulačný faktor (BAFK) ako pomer ks/ke. Konštanta eliminácie (ke) sa zvyčajne stanoví podľa krivky eliminácie (t. j. znázornenia koncentrácie testovanej látky v červoch počas fázy eliminácie). Rýchlostná konštanta vychytávania ks sa potom vypočíta z kinetiky krivky vychytávania. Uprednostňovanou metódou stanovenia hodnoty BAFK a rýchlostných konštánt ks a ke sú nelineárne metódy odhadovania parametrov pomocou počítača (pozri dodatok 2). Ak je zrejmé, že eliminácia nie je prvého rádu, je potrebné použiť komplexnejšie modely (25) (27) (52).

72. Akumulačný faktor bioty k sedimentu (BSAF) sa stanoví normalizáciou hodnoty BAFK podľa obsahu lipidov v červoch a celkového obsahu organického uhlíka v sedimente.

Interpretácia výsledkov

73. Ak sa namerané koncentrácie testovanej látky pohybujú na úrovni blízkej detekčnému limitu použitej analytickej metódy, výsledky treba interpretovať s opatrnosťou.

74. Jasne vymedzené krivky vychytávania a eliminácie sú známkou dobrej kvality údajov o bioakumulácii. Vo všeobecnosti by hranice spoľahlivosti pre hodnoty BAF v dobre navrhnutých štúdiách nemali presiahnuť 25 % (5).

Protokol o skúške

75. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti, napr. log K_{ow}, rozpustnosť vo vode,

— chemické identifikačné údaje, zdroj testovanej látky, identita a koncentrácia akéhokoľvek použitého rozpúšťadla,

— ak sa použije rádioaktívne označená látka, presná poloha označených atómov, špecifická rádioaktivita a percento rádioaktivity spojenej s nečistotami.

Testovacie druhy

— vedecký názov, kmeň, pôvod, všetky predúpravy, aklimatizácia, vek, rozsah hmotností atď.

Podmienky testu

— použitý postup testu (napr. statický, semistatický alebo prietokový),

— typ a charakteristiky použitého osvetlenia a dĺžka fotoperiódy/fotoperiód,

— koncepcia testu [napr. počet, materiál a veľkosť skúšobných komôr, objem vody, hmotnosť a objem sedimentu, rýchlosť výmeny celého objemu vody (pri prietokových alebo semistatických postupoch), akékoľvek prevzdušňovanie pred testom a počas neho, počet replikátov, počet červov na replikát, počet testovaných koncentrácií, dĺžka vychytávacej fázy a fázy eliminácie, frekvencia odberov vzoriek],

— metóda prípravy a aplikácie testovanej látky, ako aj dôvody pre výber konkrétnej metódy,

— nominálne testované koncentrácie,

— zdroj zložiek umelej vody a sedimentu alebo – ak sa použije prírodné médium – pôvod vody a sedimentu, opis všetkých predúprav, výsledky preukazujúce schopnosť testovacích živočíchov žiť a/alebo rozmnožovať sa v použitom médiu, charakteristiky sedimentu [pH a obsah amoniaku vo vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu (prírodné usadeniny), obsah organického uhlíka (TOC), rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a ílu), percentuálny obsah vody a všetky ostatné vykonané merania] a vlastnosti vody [pH, tvrdosť, vodivosť, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úroveň zostatkového chlóru (ak sa merala) a všetky ostatné vykonané merania],

— menovitá a nameraná suchá hmotnosť v % mokrej hmotnosti (alebo pomer suchej hmotnosti k mokrej hmotnosti) umelého sedimentu, nameraná suchá hmotnosť v % mokrej hmotnosti (alebo pomer suchej hmotnosti k mokrej hmotnosti) sedimentov z terénu,

— kvalita vody v skúšobných komorách charakterizovaná teplotou, pH, obsahom amoniaku, celkovou tvrdosťou a koncentráciou rozpusteného kyslíka,

— podrobné informácie o manipulácii so vzorkami vody, sedimentu a červov vrátane údajov o príprave, skladovaní, postupoch obohacovania, extrakcii a analytických postupoch (a presnosti) merania obsahu testovanej látky a lipidov a výťažku testovanej látky.

Výsledky

— úmrtnosť kontrolných červov a červov v jednotlivých skúšobných komorách a všetky pozorované subletálne účinky vrátane nezvyčajného správania (napr. vyhýbanie sa sedimentu, prítomnosť alebo neprítomnosť fekálnych peliet, neprítomnosť rozmnožovania),

— nameraná suchá hmotnosť v % mokrej hmotnosti (alebo pomer suchej hmotnosti k mokrej hmotnosti) sedimentu a testovacích organizmov (užitočné na účely normalizácie),

— obsah lipidov v červoch,

— krivky znázorňujúce vychytávaciu a eliminačnú kinetiku testovanej látky v červoch a čas do dosiahnutia ustáleného stavu,

— hodnoty C_a, C_s a C_w (so štandardnou odchýlkou a rozsahom, ak je to vhodné) pre všetky časy odberu vzoriek (C_a vyjadrené v g kg^{-1} mokrej a suchej hmotnosti celého tela, C_s vyjadrené v g kg^{-1} mokrej a suchej hmotnosti sedimentu a C_w v mg l^{-1}). Ak sa požaduje akumulačný faktor bioty k sedimentu (BSAF, pozri vymedzenie pojmu v dodatku 1) (napr. na porovnanie výsledkov z dvoch alebo viacerých testov vykonaných so živočíchmi s odlišným obsahom lipidov), hodnota C_a by sa navyše mala vyjadriť ako g kg^{-1} obsahu lipidov v organizme a hodnota C_s ako g kg^{-1} organického uhlíka (OC) v sedimente,

— hodnota BAF (vyjadrená v kg mokrého sedimentu kg^{-1} mokrých červov), konštanta vyjadrujúca rýchlosť sorpcie látok sedimentu k_s (vyjadrená v g mokrého sedimentu kg^{-1} mokrých červov na deň d^{-1}) a rýchlostná konštanta eliminácie k_e (vyjadrená v dňoch d^{-1}). Okrem toho možno uviesť aj hodnotu BSAF (vyjadrenú v kg OC sedimentu kg^{-1} obsahu lipidov v červoch),

— neeliminované rezíduá (NER) na konci fázy eliminácie,

— ak sa merajú: percentá východiskovej látky, produktov degradácie a viazaných rezíduí (t. j. percento testovanej látky, ktorú nemožno extrahovať bežnými metódami extrakcie) zistené v testovacích živočíchoch,

— metódy použité na štatistické analýzy údajov.

Vyhodnotenie výsledkov

— súlad výsledkov s kritériami validity uvedenými v bode 21,

— neočakávané alebo nezvyčajné výsledky, napr. neúplná eliminácia testovanej látky z testovacích živočíchov. V takých prípadoch môžu užitočné informácie poskytnúť výsledky z prípadnej predbežnej štúdie.

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov a jednotky

Umelý sediment alebo umelo pripravený, rekonštituovaný alebo syntetický sediment je zmes materiálov použitých na napodobnenie fyzických zložiek prírodného sedimentu.

Bioakumulácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej látky v alebo na organizme vzhľadom na koncentráciu testovanej látky v okolitom médiu. Bioakumulácia je výsledkom procesov biokoncentrácie a biomagnifikácie (pozri ďalej).

Bioakumulačný faktor (BAF) v akomkoľvek čase počas vychytávacej fázy tohto testu bioakumulácie je koncentrácia testovanej látky v/na testovacom organizme (C_a v g kg^{-1} mokrej alebo suchej hmotnosti) vydelená koncentráciou látky v okolitom médiu (C_s ako g kg^{-1} mokrej alebo suchej hmotnosti sedimentu). V záujme súladu s jednotkami parametrov C_a a C_s sa hodnota BAF uvádza v jednotkách kg sedimentu kg^{-1} červov (15).

Bioakumulačné faktory vypočítané priamo na základe pomeru konštanty vyjadrujúcej rýchlosť sorpcie látok sedimentu a rýchlostnej konštanty eliminácie (k_s, resp. k_e, pozri ďalej) sa označujú ako kinetický bioakumulačný faktor (BAF_K).

Biokoncentrácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej látky v alebo na organizme, ktoré je výsledkom výlučne absorpcie povrchu telom, vzhľadom na koncentráciu testovanej látky v okolitom médiu.

Biomagnifikácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej látky v alebo na organizme, ktoré je dôsledkom najmä vychytávania z kontaminovanej potravy alebo koristi, vzhľadom na koncentráciu testovanej látky v potrave alebo koristi. Biomagnifikácia môže viesť k prenosu alebo akumulácii testovanej látky v rámci potravinového reťazca.

Akumulačný faktor bioty k sedimentu (BSAF) je koncentrácia testovanej látky v ustálenom stave v/na testovacom organizme normalizovaná z hľadiska obsahu lipidov vydelená koncentráciou testovanej látky v ustálenom stave v sedimente normalizovanou z hľadiska obsahu organického uhlíka. Hodnota C_a je potom vyjadrená ako $g \cdot kg^{-1}$ obsahu lipidov v organizme a C_s ako $g \cdot kg^{-1}$ obsahu organických látok v sedimente.

Obdobie uvádzania do podmienok sa používa na stabilizáciu mikrobiálnej zložky sedimentu a na odstránenie napr. amoniaku pochádzajúceho zo zložiek sedimentu pred obohatením sedimentu testovanou látkou. Po uvedení do podmienok sa zvyčajne odstráni nadložná voda.

Eliminácia testovanej látky je strata tejto látky z tkaniva testovacieho organizmu aktívnymi alebo pasívnymi procesmi, ku ktorým dochádza bez ohľadu na prítomnosť alebo neprítomnosť testovanej látky v okolitom médiu.

Fáza eliminácie je čas nasledujúci po prenose testovacích organizmov z kontaminovaného média do média bez obsahu testovanej látky, počas ktorého sa skúma eliminácia (alebo čistá strata) látky z testovacích organizmov.

Rýchlostná konštanta eliminácie (k_e) je číselná hodnota vyjadrujúca rýchlosť znižovania koncentrácie testovanej látky v/na testovacom organizme po prenose testovacích organizmov z média obsahujúceho testovanú látku do média bez chemikálie. Hodnota k_e je vyjadrená v dňoch d^{-1}.

Obdobie dosahovania rovnováhy sa používa na umožnenie rozdelenia testovanej látky medzi pevnú fázu, vodu nachádzajúcu sa v póroch sedimentu a nadložnú vodu pred obohatením sedimentu testovanou látkou a pred pridaním testovacích organizmov.

Rozdeľovacia konštanta oktanol – voda (K_{ow}) je pomer rozpustnosti látky v n-oktanole a vo vode v rovnovážnom stave, niekedy vyjadrený aj ako P_{ow}. Logaritmus K_{ow} (log K_{ow}) sa používa na vyjadrenie potenciálu látky na bioakumuláciu vo vodných organizmoch.

Rozdeľovacia konštanta organický uhlík – voda (K_{oc}) je pomer koncentrácie látky v/na frakcii sedimentu tvorenej organickým uhlíkom a koncentrácie látky vo vode v rovnovážnom stave.

Nadložná voda je voda nachádzajúca sa v testovacej nádobe nad sedimentom.

Plató alebo **ustálený stav** sa vymedzuje ako rovnováha medzi procesmi vychytávania a eliminácie, ku ktorým dochádza súčasne počas expozičnej fázy. Pri grafickom znázornení závislosti hodnoty BAF v jednotlivých časoch odberu vzoriek od času nastáva ustálený stav vtedy, keď sa priebeh krivky stane rovnobežným s časovou osou a tri po sebe idúce analýzy BAF uskutočnené na vzorkách odobratých minimálne v dvojdňových intervaloch sa od seba neodlišujú o viac ako 20 % a medzi týmito tromi časmi odberu vzoriek neexistujú štatisticky významné rozdiely. V prípade testovaných látok, ktoré sa vychytávajú pomalšie, je vhodnejšie použiť intervaly v trvaní sedem dní (5).

Voda nachádzajúca sa v póroch sedimentu alebo intersticiálna voda je voda nachádzajúca sa v priestore medzi časticami sedimentu alebo pôdy.

Konštanta vyjadrujúca rýchlosť sorpcie látok sedimentu (k_s) je číselná hodnota vyjadrujúca rýchlosť zvyšovania koncentrácie testovanej látky v/na testovacom organizme v dôsledku vychytávania zo sedimentovej fázy. Hodnota k_s je vyjadrená v g sedimentu kg^{-1} červov na deň d^{-1}.

Obohatený sediment je sediment, do ktorého bola pridaná testovaná látka.

Rovnovážny bioakumulačný faktor (BAFss) je BAF v ustálenom stave, ktorý sa v priebehu dlhšieho obdobia výrazne nemení, pričom koncentrácia testovanej látky v okolitom médiu (C_s ako g kg^{-1} mokrej alebo suchej hmotnosti sedimentu) je počas tohto obdobia konštantná.

Vychytávacia fáza alebo expozičná fáza je čas, počas ktorého sú testovacie organizmy vystavené pôsobeniu testovanej látky.

Dodatok 2

Výpočet parametrov vychytávania a eliminácie

Hlavným sledovaným parametrom testu bioakumulácie je bioakumulačný faktor BAF. Nameranú hodnotu BAF možno vypočítať tak, že koncentrácia testovanej látky v testovacom organizme C_a sa vydelí koncentráciou testovanej látky v sedimente C_s v ustálenom stave. Ak sa počas vychytávacej fázy nedosiahne ustálený stav, hodnota BAF sa vypočíta rovnakým spôsobom pre 28. deň. Treba však uviesť, či je hodnota BAF založená na koncentráciách v ustálenom stave alebo nie.

Uprednostňovaným spôsobom stanovenia kinetického bioakumulačného faktora (BAF_K), konštanty vyjadrujúcej rýchlosť sorpcie látok sedimentu (k_s) a rýchlostnej konštanty eliminácie (k_e) sú nelineárne metódy odhadovania parametrov pomocou počítača. S použitím časových radov priemerných akumulačných faktorov (C_a, priemerné hodnoty pre každý deň odberu vzoriek/C_s, priemerné hodnoty pre každý deň odberu vzoriek = AF) vychytávacej fázy na základe mokrej hmotnosti červov a sedimentu a na základe modelovej rovnice:

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[rovnica 1]}$$

kde AF(t) je pomer koncentrácie testovanej látky v červoch a jej koncentrácie v sedimente v ktoromkoľvek časovom bode (t) vychytávacej fázy, tieto počítačové programy vypočítajú hodnoty BAF_K, k_s a k_e.

Ak sa počas vychytávacej fázy dosiahne ustálený stav (t. j. t = ∞), rovnicu 1 možno skrátiť na:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[rovnica 2]}$$

kde

k_s = rýchlostná konštanta vychytávania v tkanive [g sedimentu kg^{-1} červov na deň d^{-1}],

k_e = rýchlostná konštanta eliminácie [d^{-1}]

Potom $k_s/k_e \times C_s$ je prístup k výpočtu koncentrácie testovanej látky v tkanive červov v ustálenom stave ($C_{a,ss}$).

Akumulačný faktor bioty k sedimentu (BSAF) sa má vypočítať takto:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

kde foc je frakcia organického uhlíka v sedimente a flip je frakcia lipidov v červoch, pričom obidve hodnoty sú založené na suchej alebo mokrej hmotnosti.

Vzhľadom na časový rad hodnôt koncentrácie možno kinetiku eliminácie modelovať s využitím týchto modelových rovníc a metódy odhadu nelineárnych parametrov založenej na počítačovom výpočte.

Ako základný východiskový bod sa odporúča použiť priemerné namerané telesné rezíduá na konci vychytávacej fázy. Hodnoty modelované/odhadnuté podľa vychytávacej fázy by sa mali použiť len vtedy, keď sa napr. nameraná hodnota významne odchyľuje od modelovaného telesného rezídua. Informácie o alternatívnej predexpozícii červov určených na stanovenie eliminácie nájdete aj v bode 50. Podľa tohto prístupu sa predpokladá, že vzorky týchto predexponovaných červov poskytujú v 0. deň fázy eliminácie realistickú hodnotu telesného rezídua, z ktorej možno vychádzať pri stanovovaní kinetiky eliminácie.

Ak dátové body zakreslené v závislosti od času poukazujú na konštantný exponenciálny pokles koncentrácie testovanej látky v živočíchoch, na opísanie časového priebehu eliminácie možno použiť jednokompartmentový model (rovnica 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[rovnica 3]}$$

Procesy eliminácie sa niekedy javia ako dvojfázové, pričom počas počiatočnej fázy vykazujú rýchly pokles hodnoty C_a, ktorý sa mení na pomalšiu stratu testovaných látok v neskoršej fáze eliminácie (8) (19) (25). Dve fázy možno interpretovať na základe predpokladu, že v organizme existujú dva rôzne kompartmenty, z ktorých sa testovaná látka stráca rôznymi rýchlosťami. V týchto prípadoch je potrebné si preštudovať konkrétnu literatúru (15) (16) (17) (25).

Dvojkompartmentová eliminácia je opísaná napr. touto rovnicou (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[rovnica 4]}$$

A a B predstavujú veľkosť kompartmentov (v percente celkového tkanivového rezídua), kde A je kompartment s rýchlou stratou látky a B kompartment s pomalou stratou testovanej látky. Súčet A a B sa rovná 100 % celého objemu kompartmentov živočícha v ustálenom stave. Hodnoty k_a a k_b predstavujú príslušné konštanty eliminácie [d^{-1}]. Ak sa dvojkompartmentový model použije na údaje o depurácii, rýchlostná konštanta vychytávania k_s sa môže stanoviť takto (53) (54):

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

Tieto modelové rovnice by sa však mali používať opatrne, najmä ak počas testu dôjde k zmenám v biodostupnosti testovanej látky (42).

Alternatívne možno pomocou uvedených modelových rovníc vypočítať aj kinetické parametre (k_s a k_e) v jednom teste s použitím modelu kinetiky prvého rádu na všetky údaje z vychytávacej fázy a fázy eliminácie dohromady. Opis metódy, ktorá umožňuje tento kombinovaný výpočet rýchlostných konštánt vychytávania a eliminácie, možno nájsť v odkazoch (55), (56) a (57).

Neeliminované rezíduá (NER) sa majú vypočítať ako sekundárny sledovaný parameter vynásobením pomeru priemernej koncentrácie v červoch (C_a) v 10. deň fázy eliminácie a priemernej koncentrácie v červoch (C_a) v ustálenom stave (28. deň vychytávacej fázy) číslom 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ na konci eliminácie(priemer)} \times 100}{C_a \text{ pri ustálenom stave(priemer)}}}$$

Dodatok 3

Príklad harmonogramu odberov vzoriek počas 28-dňového testu bioakumulácie

a) **Vychytávacia fáza (vrátane štvordňovej fázy dosahovania rovnováhy)**

Deň	Činnosti
– 6.	Príprava rašelinovej suspenzie pre sediment, uvedenie suspenzie do podmienok na 48 hod.
– 4.	Obohatenie sedimentu alebo frakcie sedimentu, zmiešanie všetkých zložiek sedimentu, odobratie vzoriek sedimentu s aplikovanou látkou a kontrolného sedimentu s rozpúšťadlom na stanovenie koncentrácie testovanej látky, pridanie nadložnej vody, inkubácia v testovacích podmienkach (fáza dosahovania rovnováhy)
– 3./– 2.	Oddelenie testovacích organizmov z kultúry na účely aklimatizácie
0.	Meranie kvality vody (pozri bod 52), odobratie replikátov na účely odberu vzoriek vody a sedimentu na stanovenie koncentrácie testovanej látky, náhodné rozdelenie červov do skúšobných komôr, zachovanie dostatočného počtu podvzoriek červov na stanovenie analytických hodnôt v pozadí, kontrola prívodu vzduchu, ak sa použije uzavretý systém
1.	Odobratie replikátov na účely odberu vzoriek, kontrola prívodu vzduchu, správania červov, kvality vody (pozri bod 56), odobratie vzoriek vody, sedimentu a červov na stanovenie koncentrácie testovanej látky
2.	Kontrola prívodu vzduchu, správania červov a teploty
3.	Rovnaké ako v 1. deň
4. – 6.	Rovnaké ako v 2. deň
7.	Rovnaké ako v 1. deň, kompenzácia odparenej vody, ak je to potrebné
8. – 13.	Rovnaké ako v 2. deň
14.	Rovnaké ako v 1. deň, kompenzácia odparenej vody, ak je to potrebné
15. – 20.	Rovnaké ako v 2. deň
21.	Rovnaké ako v 1. deň, kompenzácia odparenej vody, ak je to potrebné
22. – 27.	Rovnaké ako v 2. deň
28.	Rovnaké ako v 1. deň, meranie kvality vody (pozri bod 52), koniec vychytávacej fázy, zachovanie dostatočného počtu podvzoriek červov na stanovenie analytických hodnôt v pozadí, mokrej a suchej hmotnosti a obsahu lipidov, prenos červov zo zvyšných exponovaných replikátov do nádob obsahujúcich čistý sediment na účely fázy eliminácie (bez vyprázdnenia čriev), odobratie vzoriek vody, sedimentu a červov z kontrolných skupín s rozpúšťadlom, odobratie vzoriek zachytávacích roztokov, ak sa používajú.
	Činnosti pred expozíciou (fáza dosahovania rovnováhy) by sa mali naplánovať s ohľadom na vlastnosti testovanej látky. Ak je to potrebné, uvedenie pripraveného sedimentu pod nadložnou vodou do podmienok pri teplote 20 ± 2 °C počas siedmich dní – v takom prípade skoršia príprava sedimentu!
	Činnosti opísané pre 2. deň by sa mali vykonávať denne (aspoň cez pracovné dni).

b) **Fáza eliminácie**

Deň	Činnosti
– 6.	Príprava rašelinovej suspenzie pre sediment, uvedenie suspenzie do podmienok na 48 hod.
– 4.	Zmiešanie všetkých zložiek sedimentu, odobratie vzoriek sedimentu s aplikovanou látkou a kontrolného sedimentu s rozpúšťadlom na stanovenie koncentrácie testovanej látky, pridanie nadložnej vody, inkubácia v testovacích podmienkach
0. (28. deň vychytávacej fázy)	Meranie kvality vody (pozri bod 52), prenos červov zo zvyšných exponovaných replikátov do nádob obsahujúcich čistý sediment, po **4 – 6 hod.** odobratie replikátov na účely odberu vzoriek vody, sedimentu a červov na stanovenie koncentrácie testovanej látky, náhodné rozdelenie červov do skúšobných komôr,
1.	Odobratie replikátov na účely odberu vzoriek, kontrola prívodu vzduchu, správania červov, kvality vody (pozri bod 52), odobratie vzoriek vody, sedimentu a červov na stanovenie koncentrácie testovanej látky
2.	Kontrola prívodu vzduchu, správania červov a teploty
3.	Rovnaké ako v 1. deň
4.	Rovnaké ako v 2. deň
5.	Rovnaké ako v 1. deň
6.	Rovnaké ako v 2. deň
7.	Rovnaké ako v 1. deň, kompenzácia odparenej vody, ak je to potrebné
8. – 9.	Rovnaké ako v 2. deň
10.	Rovnaké ako v 1. deň, koniec fázy eliminácie, meranie kvality vody (pozri bod 52), odobratie vzoriek vody, sedimentu a červov z kontrolných skupín s rozpúšťadlom, odobratie vzoriek zachytávacích roztokov, ak sa používajú.
	Príprava sedimentu pred začiatkom fázy eliminácie by mala byť rovnaká ako pred vychytávacou fázou.
	Činnosti opísané pre 2. deň by sa mali vykonávať denne (aspoň cez pracovné dni).

Dodatok 4

Niektoré fyzikálno-chemické charakteristiky prijateľnej riediacej vody

ZLOŽKA	KONCENTRÁCIE
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 µg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórové pesticídy a polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

ZLOŽENIE ODPORÚČANEJ REKONŠTITUOVANEJ VODY

a) Roztok chloridu vápenatého

Rozpustite 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ v deionizovanej vode, doplňte deionizovanou vodou do 1 l.

b) Roztok síranu horečnatého

Rozpustite 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ v deionizovanej vode, doplňte deionizovanou vodou do 1 l.

c) Roztok hydrogénuhličitanu sodného

Rozpustite 2,59 g $NaHCO_3$ v deionizovanej vode, doplňte deionizovanou vodou do 1 l.

d) Roztok chloridu draselného

Rozpustite 0,23 g KCl v deionizovanej vode, doplňte deionizovanou vodou do 1 l.

Všetky chemikálie musia byť analytickej čistoty.

Vodivosť destilovanej alebo deionizovanej vody by nemala presiahnuť 10 μScm^{-1}.

25 ml každého z roztokov a) až d) sa zmieša a celkový objem doplní deionizovanou vodou na 1 l. Súčet iónov vápnika a horčíka v tomto roztoku je 2,5 mmol/l

Pomer iónov Ca: Mg je 4: 1 a pomer iónov Na: K je 10: 1. Kyselinová kapacita $K_{S4.3}$ tohto roztoku je 0,8 mmol/l.

Prevzdušňujte riediacu vodu, kým sa nenasýti kyslíkom, potom ju pred použitím približne na dva dni uskladnite bez ďalšieho prevzdušňovania.

Hodnota pH prijateľnej riediacej vody by mala byť v rozmedzí 6 – 9.

Dodatok 5

Umelý sediment – odporúčania na prípravu a skladovanie

Na rozdiel od požiadaviek v testovacej metóde C.8 (40) sa odporúča, aby obsah rašeliny v umelom sedimente bol 2 % namiesto 10 % suchej hmotnosti, aby to zodpovedalo nízkemu až stredne vysokému obsahu organických látok v prírodných sedimentoch (58).

Percento suchých zložiek umelého sedimentu:

Zložka	Charakteristika	% suchého sedimentu
Rašelina	Rašelinníková rašelina, stupeň rozkladu: ‚stredný', sušená na vzduchu, bez viditeľných rastlinných zvyškov, jemne mletá (veľkosť častíc ≤ 0,5 mm)	2 + 0,5
Kremenný piesok	Veľkosť zrniek: ≤ 2 mm, ale > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 µm	76
Kaolín	Obsah kaolinitu ≥ 30 %	22 + 1
Zdroj potravy	*Folia urticae*, listy *Urtica spp.* (pŕhľava) rozomleté na jemný prášok (veľkosť častíc ≤ 0,5 mm) alebo zmes rozomletých listov *Urtica spp.* s alfa-celulózou (1: 1); v súlade s farmaceutickými normami pre ľudskú spotrebu, pridané do suchého sedimentu	0,4 – 0,5 %
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý, pridaný do suchého sedimentu	0,05 – 1
Deionizovaná voda	Vodivosť ≤ 10 µS/cm, pridaná do suchého sedimentu	30 – 50

Ak sa predpokladá zvýšená koncentrácia amoniaku, napr. ak je známe, že testovaná látka inhibuje nitrifikáciu, môže byť užitočné nahradiť 50 % prášku zo žihľavy bohatého na dusík celulózou (napr. α-celulóza v prášku, chemicky čistá, veľkosť častíc ≤ 0,5 mm).

Príprava

Rašelina sa usuší na vzduchu a rozomelie na jemný prášok (veľkosť zrna ≤ 0,5 mm, bez viditeľných rastlinných zvyškov). Pomocou vysokovýkonného homogenizačného zariadenia sa pripraví suspenzia požadovaného množstva rašelinového prášku s použitím časti deionizovanej vody, ktorá sa má pridať do suchého sedimentu [objem vody 11,5 × suchá hmotnosť rašeliny je vhodný na vytvorenie miešateľnej rašelinovej kaše (8)].

Hodnota pH tejto suspenzie sa upraví na 5,5 ± 0,5 pomocou $CaCO_3$. Suspenzia sa aspoň na dva dni uvedie do podmienok jemným premiešavaním pri teplote 20 ± 2 °C, aby sa stabilizovalo pH a vytvorila stabilná mikrobiálna zložka. Znova sa odmeria pH a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,0 ± 0,5. Potom sa celá suspenzia zmieša s ostatnými suchými zložkami, pričom sa zohľadní prípadná časť použitá na obohatenie. Pridá sa zvyšná deionizovaná voda, aby sa získal homogénny sediment. Znova sa odmeria pH a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,5 až 7,5. Ak sa však očakáva tvorba amoniaku, môže byť užitočné udržiavať pH sedimentu nižšie ako 7,0 (napr. medzi 6,0 a 6,5). Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa určila suchá hmotnosť a obsah organického uhlíka. Ak sa očakáva tvorba amoniaku, umelý sediment sa môže predtým, ako sa obohatí o testovanú látku, sedem dní uvádzať do podmienok, aké sa použijú v nasledujúcom teste (napr. pomer sediment – voda 1: 4, výška vrstvy sedimentu ako v testovacích nádobách), t. j. mal by sa prekryť vodou, ktorá by sa mala prevzdušňovať. Na konci obdobia uvádzania do podmienok je nutné odstrániť a zlikvidovať nadložnú vodu. Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa určila suchá hmotnosť a celkový obsah organického uhlíka (napr. tri vzorky).

Potom sa obohatený kremenný piesok zmieša so sedimentom pre každú koncentráciu testovanej látky, sediment sa rozdelí do replikačných testovacích nádob a prekryje testovacou vodou (napr. pomer sediment – voda 1: 4, výška vrstvy sedimentu ako v testovacích nádobách). Nádoby sa potom inkubujú za rovnakých podmienok, aké sa použijú v nasledujúcom teste. V tomto bode sa začína obdobie dosahovania rovnováhy. Nadložnú vodu je potrebné prevzdušňovať.

Zvolený zdroj potravy by sa mal pridať pred obohatením sedimentu testovanou látkou alebo počas neho. Najskôr ho možno zmiešať s rašelinovou suspenziou (pozri vyššie). Nadmernej degradácii zdroja potravy pred pridaním testovacích organizmov – napr. v prípade dlhého obdobia dosahovania rovnováhy – však možno predísť tým, že obdobie medzi pridaním potravy a začiatkom expozície bude čo najkratšie. S cieľom zabezpečiť, aby potrava bola v dostatočnom kontakte s testovanou látkou, by sa zdroj potravy mal zmiešať so sedimentom najneskôr v deň, keď sa testovaná látka pridá do sedimentu. Výnimkou môže byť prípad, keď dĺžka obdobia dosahovania rovnováhy vedie k nadmernej mikrobiálnej degradácii potravy pred pridaním testovacích organizmov. Odoberú sa vzorky sedimentu na stanovenie suchej hmotnosti a celkového obsahu organického uhlíka (napr. tri vzorky obohateného alebo kontrolného sedimentu).

Suchá hmotnosť zložiek (rašelina, piesok, kaolín) by sa mala uvádzať v g a percentách celkovej suchej hmotnosti.

Objem vody, ktorá sa pri príprave sedimentu pridáva do suchých zložiek, by sa mal uviesť aj v percente celkovej suchej hmotnosti (napr. 100 % suchej hmotnosti + 46 % vody znamená, že na 1 000 g suchej hmotnosti sa pridá celkovo 460 ml vody a vznikne 1 460 g mokrého sedimentu).

Skladovanie

Suché zložky umelého sedimentu sa môžu skladovať na suchom a chladnom mieste pri izbovej teplote. Pripravený mokrý sediment možno skladovať (len na ďalšie použitie v kultúre) pri teplote 4 ± 2 °C v tme počas dvoch až štyroch týždňov odo dňa prípravy (8).

Sediment obohatený o testovanú látku by sa mal ihneď použiť, pokiaľ nie sú k dispozícii informácie, že konkrétny sediment možno skladovať bez toho, aby to malo vplyv na toxicitu a biodostupnosť testovanej látky. Vzorky obohateného sedimentu sa môžu až do analýzy skladovať v podmienkach odporúčaných pre konkrétnu testovanú látku.

Dodatok 6

Odporúčané druhy máloštetinavcov na testovanie bioakumulácie

Tubifex tubifex* (MÜLLER), *Tubificidae, Oligochaeta

Máloštetinavec *Tubifex tubifex* (Müller) z čeľade *Tubificidae* (*Oligochaeta*) žije v sedimentoch sladkých vôd v trubiciach vystlaných hlienom. Červy žijú v týchto trubiciach hlavou nadol a požierajú častice sedimentu, pričom sa živia v ňom žijúcimi mikroorganizmami a organickým odpadom. Zadná časť sa zvyčajne vlní v nadložnej vode, čo umožňuje červovi dýchať. Hoci druh *Tubifex tubifex* žije v širokej škále rôznych druhov sedimentov na celej severnej pologuli, uprednostňuje pomerne jemné častice (59). Vhodnosť tohto druhu na ekotoxikologické testovanie je opísaná napríklad v odkazoch (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

Metódy kultivácie

Na to, aby sa získal dostatočný počet červov *Tubifex tubifex* na vykonanie testov bioakumulácie, sa červy musia chovať v stálej laboratórnej kultúre. Na kultiváciu červov *T. tubifex* sa odporúča použiť systém zložený z umelého sedimentu založeného na umelo pripravenej pôde podľa testovacej metódy C.8 (40) a z rekonštituovanej vody podľa testovacej metódy C.1 (8).

Ako kultivačné nádoby možno použiť nádoby zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele s výškou 12 – 20 cm. Do každej kultivačnej nádoby sa pridá vrstva mokrého umelého sedimentu pripravená podľa opisu v dodatku 5. Hĺbka vrstvy sedimentu by mala umožniť prirodzené zahrabávanie červov (minimálna hĺbka 2 cm pre *T. tubifex*). Do systému sa pridá rekonštituovaná voda. Treba dbať na to, aby sa minimalizovalo narušenie sedimentu. Voda sa jemne prevzdušňuje (napr. dve bubliny za sekundu pomocou vzduchu filtrovaného 0,45 µm filtrom) s použitím Pasteurovej pipety umiestnenej 2 cm nad povrchom sedimentu. Odporúčaná teplota kultúry je 20 ± 2 °C.

Červy sa pridávajú do kultivačného systému s maximálnou násadou 20 000 jedincov/m^2 povrchu sedimentu. Väčšia násada môže spôsobiť zníženie rýchlosti rastu a rozmnožovania (43).

V kultúrach s umelým sedimentom sa červy musia kŕmiť. Ako doplnkovú výživu možno použiť jemne mletú potravu pre ryby, napr. TetraMin® (8), Klerks 1994, osobná komunikácia. Množstvo potravy by malo umožňovať dostatočný rast a rozmnožovanie a malo by udržať hromadenie amoniaku a rast plesní v kultúre na minime. Potravu možno podávať dvakrát týždenne (napr. 0,6 – 0,8 mg/cm^2 povrchu sedimentu). Z praktických skúseností vyplynulo, že aplikovanie potravy suspendovanej a homogenizovanej v deionizovanej vode môže uľahčiť homogénnu distribúciu potravy na povrchu sedimentu v kultivačných nádobách.

Nadložná voda by sa mala vymieňať pomocou prietokového systému alebo ručne aspoň raz za týždeň, aby sa zabránilo hromadeniu amoniaku. Sediment v zásobných kultúrach by sa mal meniť každé tri mesiace.

Ak sú potrebné len dospelé jedince, vzorky červov možno odobrať z kultúry preosiatím kultivačného sedimentu cez sito s veľkosťou oka 1 mm. Na zachytenie zámotkov je vhodné sito s veľkosťou oka 0,5 mm a na zachytenie mladých červov sito s veľkosťou oka 0,25 mm. Po preosiatí sedimentu možno sitá umiestniť do rekonštituovanej vody. Keď červy opustia sito, možno ich vybrať z vody mäkkou oceľovou pinzetou alebo pipetou s hranami leštenými plameňom.

V teste alebo na založenie nových kultúr možno použiť iba neporušené a jasne identifikované jedince *Tubifex tubifex* [napr. (64)]. Choré alebo poranené červy a zámotky zamorené hubovými vláknami sa musia odstrániť.

Synchronizovaná kultúra môže byť podľa potreby zdrojom červov určitého veku vo vhodných intervaloch. Nové kultivačné nádoby sa zakladajú vo zvolených intervaloch (napr. každé dva týždne) so živočíchmi určitého veku (napr. so zámotkami). V kultivačných podmienkach, ktoré sú tu opísané, dosiahnu červy dospelosť po ôsmich až desiatich týždňoch. Červy možno odobrať z kultúry, keď nakládli nové zámotky, napr. po desiatich týždňoch. Vzorky dospelých jedincov možno použiť v teste a so zámotkami možno založiť nové kultúry.

Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), *Lumbriculidae, Oligochaeta

Lumbriculus variegatus (*Lumbriculidae, Oligochaeta*) takisto žije v sladkovodných sedimentoch na celom svete a často sa používa v ekotoxikologickom testovaní. Informácie o biológii, kultivačných podmienkach a citlivosti druhu možno nájsť v odkazoch (1) (6) (9) (36). Červa *Lumbriculus variegatus* možno s určitými obmedzeniami kultivovať aj v umelom sedimente odporúčanom pre druh *T. tubifex* podľa odkazu (8). Keďže druh *L. variegatus* v prírode uprednostňuje hrubšie sedimenty ako *T. tubifex* (59), laboratórne kultúry s umelým sedimentom používané pre *T. tubifex* môžu po štyroch až šiestich mesiacoch zaniknúť. Z praktických skúseností vyplýva, že druh *L. variegatus* možno niekoľko rokov chovať v pieskovom substráte (napr. kremenný piesok, jemný štrk) v prietokovom systéme s použitím potravy pre ryby ako zdroja výživy bez nutnosti obnovovať substrát. Hlavnou výhodou druhu *L. variegatus* oproti iným druhom vodných máloštetinavcov je jeho rýchle rozmnožovanie, ktoré vedie k rýchlo sa zväčšujúcej biomase v laboratórne kultivovaných populáciách (1) (6) (9) (10).

Metódy kultivácie

Kultivačné podmienky pre druh *Lumbriculus variegatus* sú podrobne opísané v publikáciách Phipps a kol., (1993) (10), Brunson a kol. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (6). Ďalej je uvedené stručné zhrnutie týchto podmienok.

Červy možno chovať vo veľkých akváriách (57 – 80 l) pri teplote 23 °C s fotoperiódou 16 hod. svetla: 8 hod. tmy (100 – 1 000 luxov) s použitím denne obnovovanej prírodnej vody (45 – 50 l na akvárium). Substrát sa pripraví tak, že nebielené hnedé papierové servítky sa narežú na pásy, ktoré potom možno na niekoľko sekúnd ponoriť do kultivačnej vody, čím vzniknú malé kúsky papierového substrátu. Týmto substrátom potom možno priamo pokryť dno kultivačných akvárií pre *Lumbriculus* alebo ho možno uskladniť zmrazený v deionizovanej vode na neskoršie použitie. Nový substrát vydrží v nádrži vo všeobecnosti približne dva mesiace.

Každá kultúra červov sa zakladá s 500 – 1 000 červami, ktoré sa kŕmia 10 ml suspenzie obsahujúcej 6 g štartovacej potravy pre pstruhy trikrát týždenne v podmienkach obnovovania alebo prietoku. V statických alebo semistatických kultúrach by sa červy mali kŕmiť menej, aby sa zabránilo rastu baktérií a plesní. Potrava a papierový substrát by sa mali analyzovať z hľadiska látok, ktoré sa majú použiť v testoch bioakumulácie.

Za týchto podmienok sa počet jedincov v kultúre väčšinou zdvojnásobí približne za 10 až 14 dní.

Červy *Lumbriculus variegatus* možno odobrať z kultúr napr. prenesením substrátu v sieti s jemnými okami alebo prenesením organizmov sklenenou pipetou so širokým otvorom (s priemerom približne 5 mm) leštenej plameňom do samostatnej kadičky. Ak sa do tejto kadičky prenáša aj substrát, kadička s červami a substrátom sa cez noc nechá v podmienkach prietoku. Tým sa z nej odstráni substrát, zatiaľ čo červy zostanú na dne nádoby. Potom ich možno znova vložiť do nových pripravených kultivačných nádrží alebo ďalej spracovať na účely testu podľa opisu v odkazoch (1) a (6). Je potrebné zabrániť zraneniam alebo autotómii červov, napr. tak, že pri manipulácii s nimi sa budú používať pipety s hranami leštenými plameňom alebo špendlíky z nehrdzavejúcej ocele.

Otázka, ktorou sa treba kriticky zaoberať v prípade použitia červov *L. variegatus* v testoch bioakumulácie zo sedimentu, je ich spôsob rozmnožovania (architómia nasledovaná morfalaxiou). Toto nepohlavné rozmnožovanie vedie k vzniku dvoch fragmentov, ktoré sa počas určitého obdobia nekŕmia, až kým sa neregeneruje hlavová alebo chvostová časť [napr. (36) (37)]. To znamená, že v prípade *L. variegatus* absorpcia sedimentu a kontaminujúcej látky požitím nemusí prebiehať nepretržite ako pri čeľadi *Tubificidae*, ktorej zástupcovia sa nerozmnožujú fragmentáciou.

Preto by sa mala vykonať synchronizácia, aby sa minimalizovalo nekontrolované rozmnožovanie a regenerácia, a tým aj veľké rozdiely vo výsledkoch testu. Tieto rozdiely môžu vzniknúť, keď sú niektoré jedince, ktoré sa fragmentovali, a teda sa určitý čas nekŕmia, menej vystavené testovanej látke ako ostatné jedince, ktoré sa počas testu nefragmentovali, napr. (38). Červy by sa mali 10 – 14 dní pred začiatkom expozície umelo fragmentovať (synchronizácia) (65). Mali by sa použiť veľké červy, ktoré podľa možnosti nevykazujú známky nedávnej fragmentácie. Tieto červy možno umiestniť na sklenené podložné sklíčko do kvapky kultivačnej vody a skalpelom rozrezať v strednej časti tela. Treba dbať na to, aby zadné konce boli podobnej veľkosti. Zadné konce by sa potom mali až do začiatku

expozície nechať, aby si regenerovali nové hlavy, v kultivačnej nádobe obsahujúcej rovnaký substrát, aký sa používa v kultivačnej vode, a rekonštituovanú vodu. Regenerácia nových hláv prebehla vtedy, keď sa synchronizované červy zahrabávajú do substrátu (prítomnosť regenerovaných hláv možno potvrdiť preskúmaním reprezentatívnej podvzorky pod binokulárnym mikroskopom). Očakáva sa, že testovacie organizmy budú mať podobný fyziologický stav. To znamená, že ak počas testu dôjde pri synchronizovaných červoch k regenerácii morfalaxiou, prakticky všetky živočíchy by mali byť rovnako vystavené obohatenému sedimentu. Synchronizované červy by sa mali nakŕmiť ihneď, ako sa začnú zahrabávať do substrátu, alebo sedem dní po reze. Kŕmny režim by mal byť porovnateľný s bežnými kultúrami a odporúča sa kŕmiť synchronizované červy tým istým zdrojom potravy, aký sa použije v teste. Červy sa majú chovať pri testovacej teplote 20 ± 2 °C. Po regenerácii sa v teste majú použiť neporušené úplné červy podobnej veľkosti, ktoré po jemnom mechanickom podnete aktívne plávajú alebo lezú. Je potrebné zabrániť zraneniam alebo autotómii červov, napr. tak, že pri manipulácii s nimi sa budú používať pipety s hranami leštenými plameňom alebo špendlíky z nehrdzavejúcej ocele.

Pri použití červov *Lumbriculus variegatus* v teste by vzhľadom na osobitný spôsob rozmnožovania tohto druhu malo počas testu za vhodných podmienok dôjsť k zvýšeniu počtu červov (6). Neprítomnosť rozmnožovania v teste bioakumulácie s druhom *L. variegatus* by sa mala zaznamenať a vziať do úvahy pri interpretácii výsledkov testu.

Branchiura sowerbyi (BEDDARD), _Tubificidae, Oligochaeta_ (nevalidované v kruhovom teste)

Druh *Branchiura sowerbyi* žije v rôznych druhoch sedimentu vo vodných nádržiach, jazerách, rybníkoch a riekach, pôvodne v tropických oblastiach. Možno ho nájsť aj v útvaroch s teplou vodou na severnej pologuli. Početnejší je však v bahnito-ílových sedimentoch s vysokým obsahom organickej hmoty. Červy okrem toho žijú vo vrstve sedimentu. Dokonca aj zadný koniec červov je zvyčajne zahrabaný. Tento druh sa ľahko identifikuje podľa žiabrových vlákien na zadnej časti. Dospelé jedince môžu dosiahnuť dĺžku 9 – 11 cm a mokrú hmotnosť 40 – 50 mg. Červy majú vysokú rýchlosť rozmnožovania: v podmienkach teploty a kŕmenia uvedených ďalej sa populácia zdvojnásobí za menej ako dva týždne [Aston a kol., 1982, (65)]. Druh *B. sowerbyi* sa použil v štúdiách toxicity i bioakumulácie [Marchese a Brinkhurst 1996, (31), resp. Roghair a kol. 1996, (67)].

Metódy kultivácie

Ďalej sa uvádza zhrnutie kultivačných podmienok pre druh *Branchiura sowerbyi* (poskytli Mercedes R. Marchese, INALI, Argentína a Carla J. Roghair, RIVM, Holandsko).

Nevyžaduje sa žiadna konkrétna metóda kultivácie testovacích organizmov. Organizmy možno kultivovať s použitím nekontaminovaného prírodného sedimentu (31). Z praktických skúseností vyplynulo, že médium zložené z prírodného sedimentu a piesku zlepšuje stav červov v porovnaní s čisto prírodným sedimentom (32) (67). Na kultiváciu možno použiť 3 l kadičky obsahujúce 1 500 ml média zo sedimentu/vody, ktoré sa skladá z 375 ml prírodného nekontaminovaného sedimentu (približne 10 % celkového organického uhlíka, približne 17 % častíc ≤ 63 µm), 375 ml čistého piesku (M32) a 750 ml rekonštituovanej alebo odchlórovanej vody z vodovodu (31) (32) (67). Ako substrát na kultiváciu sa môžu použiť aj papierové servítky, ale rast populácie bude nižší ako v prírodnom sedimente. V semistatických systémoch sa vrstva vody v kadičke pomaly prevzdušňuje a nadložná voda by sa mala obnovovať raz týždenne.

Každá kadička na začiatku obsahuje 25 mladých červov. Po dvoch mesiacoch sa veľké červy vyberú zo sedimentu pinzetou a vložia sa do novej kadičky s čerstvo vyrobeným médiom zo sedimentu/vody. Stará kadička obsahuje aj zámotky a mladé červy. Týmto spôsobom možno z jednej kadičky získať až 400 mladých červov. Dospelé červy možno používať na rozmnožovanie minimálne jeden rok.

Kultúry by sa mali udržiavať pri teplote 21 – 25 °C. Zmeny teploty by nemali prekročiť ± 2 °C. Čas potrebný na embryonálny vývin od nakladenia vajíčok až po okamih, keď mladý jedinec opustí zámotok, je pri teplote 25 °C približne tri týždne. Prežívajúci červ druhu *B. sowerbyi* vytvorí 6,36 (31) až 11,2 (30) vajíčok v bahne pri teplote 25 °C. Počet vajíčok na zámotok je v rozmedzí od 1,8 do 2,8 (66) (69) alebo maximálne 8 (68).

Každý týždeň by sa mal odmerať rozpustený kyslík, tvrdosť vody, teplota a pH. Dvakrát alebo trikrát týždenne možno pridať potravu pre ryby (napr. TetraMin®) ako suspenziu *ad libitum*. Červy možno kŕmiť aj rozmrazeným šalátom *ad libitum*.

Veľkou výhodou tohto druhu je vysoká individuálna biomasa (až 40 – 50 mg mokrej hmotnosti na jedinca). Tento druh preto možno použiť na testovanie bioakumulácie testovaných látok, ktoré nie sú rádioaktívne označené. Expozícia môže prebiehať v systémoch používaných pre druh *T. tubifex* alebo *L. variegatus* s jedným jedincom na replikát (11). V takom prípade by sa však mal zvýšiť počet replikátov, pokiaľ sa nepoužijú väčšie skúšobné komory (11). Pri tomto druhu je potrebné upraviť aj kritérium validity týkajúce sa zahrabávania.

LITERATÚRA

1. ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. V ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

2. Európska komisia (EK) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Úrad pre vydávanie úradných publikácií Európskych spoločenstiev, Luxemburg.

3. OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD), Paríž.

4. Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. a Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885 – 1894.

5. Kapitola C.13 tejto prílohy, biokoncentrácia: prietokový rybí test.

6. U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marec 2000.

7. Kapitola C.27 tejto prílohy, test toxicity *Chironomidae* v systéme sediment – voda za použitia obohateného sedimentu

8. Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. a Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835 – 852.

9. Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. a Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the *oligochaete, Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872 – 885.

10. Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. a Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269 – 279.

11. Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. a Studinger, G. (1999). Workshop on ‚Bioaccumulation: Sediment test using benthic *oligochaetes*‘, 26. – 27.4.1999, Hochheim/Main, Nemecko. Report on the R +D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlín.

12. Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic *oligochaetes* by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

13. Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. a Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301 – 310.

14. Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. V: R. Nagel a R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlín 1990. VCH, Weinheim.

15. Landrum, P.F., Lee II, H. a Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709 – 1725.

16. Markwell, R.D., Connell, D.W. a Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by *oligochaetes*. Wat. Res. 23, 1443 – 1450.

17. Gabric, A.J., Connell, D.W. a Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by *oligochaetes*. Wat. Res. 24, 1225 – 1231.

18. Kukkonen, J. a Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (*Oligochaeta*). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457 – 1468.

19. Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. a Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501 – 1514.

20. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

21. U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

22. Kapitoly tejto prílohy:

    Kapitola A.4, tlak pary

    Kapitola A.5, povrchové napätie

    Kapitola A.6, rozpustnosť vo vode

    Kapitola A.8, rozdeľovacia konštanta, metóda trepačkovej banky

    Kapitola A.24, rozdeľovacia konštanta, metóda HPLC

    Kapitola C.7, degradácia — abiotická degradácia: hadrolýza ako funkcia pH

    Kapitola C.4 A – F Stanovenie ľahkej biodegradovateľnosti

    Kapitola C.19, odhad adsorpčného koeficientu (KOC) na pôde a kale z odpadových vôd pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC).

    Kapitola C.29, ľahká biodegradovateľnosť CO2 v hermeticky uzavretých nádobách

23. OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paríž.

24. Antoine, M.D., Dewanathan, S. a Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165 – 172.

25. Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke a G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. V Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235 – 276.

26. Spacie, A. a Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309 – 320.

27. Hawker, D.W. a 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. a 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. a Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid *oligochaete* worm *Tubifex tubifex*. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061 – 1072.

30. Aston, R.J. a 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. a 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. a Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.

33. Kapitola C.1 tejto prílohy, ryby, test akútnej toxicity.

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

35. Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. a Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181 – 184.

36. Leppänen, M.T. a Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183 – 194.

37. Leppänen, M.T. a Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196 – 2202.

38. Leppänen M.T. a 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. a 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. Kapitola C.8 tejto prílohy, Toxicita pre dážďovky.

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*). V: R.O. Brinkhurst a D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175 – 184. Plenum Press, New York.

44. ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

45. Hooftman, R.N., van de Guchte, K. a Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

46. Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32, 1897 – 1905.

47. Mount, D.R., Dawson, T.D. a 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. a 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. a Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099 – 1105.

50. Bligh, E.G. a Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911 – 917.

51. De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. a Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

52. Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Dánsko.

53. Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. a Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). Sci. Total Environment 109/110, 411 – 421.

54. Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Nemecko.

55. Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries a 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. a Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277 – 285.

57. Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. a 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. a Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163 – 1175.

59. Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310 – 386.

60. Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by *oligochaete* worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785 – 790.

61. Chapman, P.M., Farrell, M.A. a Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic *oligochaetes* to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47 – 67.

62. Chapman, P.M., Farrell, M.A. a Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic *oligochaetes* to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69 – 78.

63. Rodriguez, P. a Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. V: A. Mudroch, J.M. Azcue a P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

64. Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

65. Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

66. Aston, R.J., Sadler, K. a 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. a Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

68. Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (*Tubificidae*, *Oligochaeta*) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89 – 94.

69. Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. a Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (*Oligochaeta*, *Tubificidae*). Hydrobiologia, 278, 267 – 274“.