

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2016/266

2016/EES/57/76

frá 7. desember 2015

um breytingu á reglugerð (EB) nr. 440/2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni, í því skyni að laga hana að tækniframförum (efnareglurnar (REACH)) (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 frá 18. desember 2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)), um stofnun Efnastofnunar Evrópu, um breytingu á tilskipun 1999/45/EB og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 793/93 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1488/94, sem og tilskipun ráðsins 76/769/EBE og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 91/155/EBE, 93/67/EBE, 93/105/EB og 2000/21/EB ⁽¹⁾, einkum 2. mgr. 13. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 440/2008 ⁽²⁾ er að finna þær prófunaraðferðir sem skal beitt í þeim tilgangi að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, eiturhrif og visteiturhrif iðefna að því er varðar reglugerð (EB) nr. 1907/2006.
- 2) Nauðsynlegt er að uppfæra reglugerð (EB) nr. 440/2008 til að bæta við nýjum og uppfærðum prófunaraðferðum sem Efnahags- og framfarastofnunin hefur nýlega samþykkt til að taka tillit til tækniframfara, og til að tryggja að dýrum sem eru notuð í tilraunaskyni sé fækkað, í samræmi við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/63/ESB ⁽³⁾. Haft var samráð við hagsmunaaðila um þessi drög.
- 3) Aðlögunin felur í sér tuttugu prófunaraðferðir: eina nýja aðferð til að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, ellefu nýjar prófunaraðferðir og þrjár uppfærðar prófunaraðferðir til að meta visteiturhrif og fimm nýjar prófunaraðferðir til að meta umhverfisafdrif og -hegðun.
- 4) Því ætti að breyta reglugerð (EB) nr. 440/2008 til samræmis við það.
- 5) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit nefndarinnar sem komið var á fót skv. 133. gr. reglugerðar (EB) nr. 1907/2006.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 54, 1.3.2016, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 148/2016 frá 8. júlí 2016 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, biður birtingar.

⁽¹⁾ Stjtið. ESB L 396, 30.12.2006, bls. 1.

⁽²⁾ Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 440/2008 frá 30. maí 2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)) (Stjtið. ESB L 142, 31.5.2008, bls.1).

⁽³⁾ Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/63/ESB frá 22. september 2010 um vernd dýra sem eru notuð í vísindaskyni (Stjtið. ESB L 276, 20.10.2010, bls. 33).

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 er breytt í samræmi við viðaukann við þessa reglugerð.

2. gr.

Reglugerð þessi öðlast gildi á þriðja degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*.

Reglugerð þessi er bindandi í heild sinni og gildir í öllum aðildarríkjunum án frekari lögfestingar.

Gjört í Brussel 7. desember 2015.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

VIÐAUKI

Viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 er breytt sem hér segir:

- 1) Athugasemd bætist við í byrjun viðaukans á undan A-hluta:

„Athugasemd:

Áður en einhver eftirfarandi prófunaraðferða er notuð til að prófa fjölþáttaefni, efni með óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókið myndefni eða líffræðilegt efni eða blöndu og ef nothæfi þess til prófunar á fjölþáttaefni, líffræðilegu efni eða blöndum er ekki tilgreint í þeirri prófunaraðferð, sem um ræðir, skal íhuga hvort aðferðin henti til fyrirhugaðs eftirlits.

Ef prófunaraðferð er notuð til prófunar á fjölþáttaefni, líffræðilegu efni eða blöndu skal gera fullnægjandi upplýsingar um samsetningu þess aðgengilegar að því marki sem unnt er, t.d. með efnakenni innihaldsefna þess, magnbundnu innihaldi og þeim eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.“

- 2) Kafi A.24 bætist við:

„A.24. DEILISTUÐULL (N-OKTANÓL/VATN), AÐFERÐ MEÐ HÁPRÝSTIVÖKVASKILJUN

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 117 um prófanir (2004)

1. Deilistuðullinn (P) er skilgreindur sem hlutfall jafnvægisstyrkleika uppleysts efnis í tveggja fasa kerfi sem samanstendur af tveimur leysum sem eru að mestu óblandanlegir. Ef notað er n-oktanól og vatn jafngildir

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanól}}{C_{\text{vatn}}}$$

Deilistuðullinn, sem er hlutfallið milli tveggja styrkleika, er einingalaus og er venjulega gefinn upp sem tugalogri.

2. P_{ow} er lykiltreyta í rannsóknum á afdrifum efna í umhverfinu. Sýnt hefur verið fram á að mjög marktækt samband er á milli P_{ow} í ójónuðu formi efnanna og uppsöfnun efnanna í fiski. Einnig hefur verið sýnt fram á að P_{ow} er gagnleg breyta til að spá fyrir um áslag og til að ákvarða meginleg vensl efnabyggingar og virkni að því er varðar ýmis mismunandi líffræðileg áhrif.
3. Upphafleg tillaga að þessari prófunaraðferð var byggð á grein eftir C.V. Eadsforth og P. Moser (1. heimild). Þróun prófunaraðferðarinnar og fjölsetra OECD-samanburðarprófunar var samræmd af Umweltbundesamt í Sambandslýðveldinu Þýskalandi á árinu 1986 (2. heimild).

ATRÍÐI SEM ÞARF AÐ HAFI HUGA Í UPPHAFI

4. Unnt er að ákvarða log P_{ow} -gildi á bilinu - 2 til 4 (getur stundum náð 5 eða meira)⁽⁴⁾ út frá tilraunum með hristiflöskuaðferðinni (Kafi A.8 í þessum viðauka, OECD-viðmiðunarregla 107 um prófanir). Háþrýstivökvaskiljunaraðferðin nær yfir log P_{ow} á bilinu 0 til 6 (1.–5. heimild). Þessi aðferð kann að útheimta mat á P_{ow} til að velja viðeigandi viðmiðunarefni og styðja þær niðurstöður sem leiddar eru af gögnum sem koma út úr prófuninni. Fjallað er stuttlega um aðferðir við útreikning í viðbætinum við þessa prófunaraðferð. Í háþrýstivökvaskiljuninni er skolonin framkvæmd með föstum ferðafasa.
5. P_{ow} -gildin eru háð umhverfisþáttum, s.s. hitastigi, sýrustigi, jónastyrk, o.s.frv. og þá skal skilgreina með tilraun til að P_{ow} -gögnin séu rétt túlkuð. Að því er varðar jónanleg efni gæti önnur aðferð orðið tiltæk (t.d. drög að OECD-viðmiðunarreglu um aðferð til sýrustigsmælingar á jónuðum efnum (e. *pH metric method for ionised substances*) (6. heimild)) sem hægt væri að nota sem staðgönguáðferð. Jafnvel þótt þessi drög að OECD-viðmiðunarreglu geti hentað vel til að ákvarða P_{ow} fyrir þessi jónanlegu efni á betur við í sumum tilvikum að nota háþrýstivökvaskiljunaraðferðina við sýrustig sem hefur umhverfislega þýðingu (sjá 9. lið).

⁽⁴⁾ Sett eru efri mörk vegna þess að nauðsynlegt er að ná fullkomnum aðskilnaðarfasa eftir að deilijafnvægi hefur verið stillt og áður en sýni eru tekin til magngreiningar. Með tilhlýðilegri gát má hækka efri mörkin að hærri P_{ow} -gildum.

MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

6. Í háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa eru notaðar greiningarsúlur, sem í er þjappað efni í föstum fasa sem fæst á almennum markaði og inniheldur langar kolvetniskeðjur (t.d. C₈, C₁₈) sem eru bundnar kísli með efnatengjum.
7. Íðefni, sem sprautað er inn á slíka súlu, dreifist milli ferðafasa sem er leysir og stöðufasa úr vetniskolvetni þegar ferðafasinn flytur það í gegnum súluna. Efnin sitja eftir í hlutfalli við deilistuðul þeirra milli vetniskolefna og vatns, vatnssækin efni eru skoluð út fyrst og fitusækin efni síðast. Rástíma er lýst með rýmdarstuðli k en hann fæst með formúlunni:

$$K = \frac{t_g - t_0}{t_0}$$

þar sem t_R er rástími prófunarefnis og t_0 er súlutími, þ.e. meðaltíminn sem það tekur leysissameind að komast í gegnum súluna. Megindlegar greiningaraðferðir eru óþarfar og er eingöngu nauðsynlegt að ákvarða rástíma.

8. Unnt er að reikna deilistuðul oktanóls og vatns í prófunarefni með því að ákvarða rýmdarstuðul hans k með tilraun og setja k því næst í eftirfarandi jöfnu:

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

þar sem

a, b = línulegir aðhvarfsstuðlar.

Unnt er að fá jöfnuna að ofan með línulegri aðhvarfsgreiningu á lógaritma deilistuðla oktanóls og vatns fyrir viðmiðunarefni á móti lógaritma rýmdarstuðla fyrir viðmiðunarefni.

9. Háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa gerir það kleift að meta deilistuðla á log P_{ow} -bilinu milli 0 og 6 en í undantekningartilvikum er hægt að rýmka hana til að ná yfir log P_{ow} -bilin milli 6 og 10. Þetta kann að útheimta breytingu á ferðafasanum (3. heimild). Aðferðin hentar ekki fyrir sterkar sýrur og basa, málmflóka, efni sem hvarfast við skiljuvökvann eða yfirborðsvirk efni. Eingöngu er unnt að framkvæma mælingar á jónanlegum efnum í ójónuðu formi (óbundin sýra eða óbundinn basi) með því að nota viðeigandi jafnalausn með sýrustig undir pK_a -gildinu ef um óbundna sýru er að ræða eða yfir pK_a -gildinu ef um óbundinn basa er að ræða. Einnig gæti sýrustigsmælingaraðferð til prófunar á jónanlegum efnum orðið tiltæk (6. heimild) sem hægt væri að nota sem staðgönguáferð (6. heimild). Ef log P_{ow} -gildið er ákvarðað til notkunar við umhverfshætuflokkun eða mat á umhverfisáhættu skal framkvæma prófunina á því sýrustigsbili sem á við um náttúrulegt umhverfi, þ.e. pH-gildi á bilinu 5,0–9.
10. Í sumum tilvikum geta óhreinindi torveldað túlkun niðurstaðna vegna óvissu við ákvörðun toppgilda. Að því er varðar blöndur sem verða að óaðgreinanlegum toppum skal tilgreina efri og neðri mörk fyrir log P_{ow} og svæði í % undir sérhverjum log P_{ow} -toppi. Að því er varðar blöndur, sem eru hópur raðkvæmra efna, skal einnig tilgreina vegið meðaltal log P_{ow} (7. heimild), reiknað út á grundvelli einstakra P_{ow} -gilda og samsvarandi svæði í % (8. heimild). Taka skal tillit til allra toppa sem mynda svæði sem er 5% eða meira af samanlögðu toppflatarmáli í útreikningnum (9. heimild):

$$\text{vegið meðaltal log } P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\text{svæði } i \%) }{\text{samanlagt toppflatarmál } i \%} = \frac{\sum (\log p_{owi})(\text{svæði } i \%)}{\sum_i \text{svæði } i \%}$$

Vegið meðaltal fyrir log P_{ow} gildir eingöngu fyrir efni eða blöndur (t.d. furuolíur) sem samanstanda af röð raðkvæmra efna (t.d. röð alkana). Unnt er að mæla blöndur með merkingarbærum niðurstöðum að því tilskildu að næmi greiningarnemans, sem notaður er, sé það sama gagnvart öllum efnunum í blöndunni og að unnt sé að leysa þau nægilega vel upp.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

11. Klofnunarstuðullinn, byggingarformúlan og leysnin í ferðafasanum skulu vera þekkt áður en aðferðin er notuð. Auk þess væri gagnlegt að hafa upplýsingar um vatnsrof.

GÆÐAVIÐMIÐANIR

12. Til þess að auka áreiðanleika mælinganna skulu ákvarðanir tvíteknar.
- Endurtekningarnákvæmni: Gildi fyrir $\log P_{ow}$ sem fengið er með endurteknum mælingum sem gerðar eru við sömu skilyrði og með því að nota sama safn viðmiðunarefna skal liggja á bili sem svarar til $\pm 0,1$ lograeininga.
 - Samanburðarnákvæmni: Ef mælingarnar eru endurteknar með mismunandi safni viðmiðunarefna geta niðurstöðurnar orðið mismunandi. Að jafnaði er fylgnistuðullinn R fyrir tengslin milli $\log k$ and $\log P_{ow}$ u.þ.b. 0,9 fyrir tiltekið safn prófunarefna, sem svarar til deilistuðuls oktanóls og vatns sem nemur $\log P_{ow} \pm 0,5$ lograeiningum.
13. Fjölsetrasamanburðarprófun hefur sýnt fram á að með háþrýstivökvaskiljun er hægt að fá $\log P_{ow}$ -gildi sem liggja innan $\pm 0,5$ eininga frá gildum sem fást með hristiflöskuaðferðinni (2. heimild). Annan samanburð má finna í heimildum (4.–5. heimild og 10.–12. heimild). Fylgnilínurit, sem byggjast á byggingarlega skyldum viðmiðunarefnum, gefa nákvæmstu niðurstöðurnar (13. heimild).

VIÐMIÐUNAREFNI

14. Til að fá fram fylgni milli mælds rýmdarstuðuls k fyrir efni og P_{ow} verður að setja upp kvörðunargraf þar sem notaðir er a.m.k. 6 punktar (sjá 24. lið). Notandi skal velja viðeigandi viðmiðunarefni. Að jafnaði skulu viðmiðunarefni vera með $\log P_{ow}$ -gildi sem ná yfir $\log P_{ow}$ prófunarefnanna, það þýðir að a.m.k. eitt viðmiðunarefnanna skal vera með P_{ow} sem er hærra en gildi viðmiðunarefnisins og a.m.k. eitt með lægra P_{ow} -gildi en viðmiðunarefnið. Einungis skal nota framreikning í undantekningartilvikum. Æskilegt er að þessi viðmiðunarefni séu byggingarlega skyld prófunarefnum. $\log P_{ow}$ -gildi viðmiðunarefnanna, sem notuð eru við kvörðun, skulu byggjast á áreiðanlegum tilraunagögnum. Að því er varðar efni með hátt $\log P_{ow}$ -gildi (venjulega hærra en 4) má þó nota reiknuð gildi nema áreiðanleg tilraunagögn séu tiltæk. Ef notuð eru framreiknuð gildi skal vísa til viðmiðunarmarkna.
15. Viðamiklar skrár með $\log P_{ow}$ -gildum fyrir marga íðefnaflokka eru tiltækar (14.–15. heimild). Séu gögn um deilistuðla byggingarlega skyldra efna ekki fáanleg má notast við almennari kvörðun sem fengin er með öðrum viðmiðunarefnum. Ráðlögð viðmiðunarefni og P_{ow} -gildi þeirra eru skráð í töflu 1. Þegar um er að ræða jónanleg efni eiga uppgefin gildi við um ójónað form þeirra. Gildin voru gátuð með tilliti til áreiðanleika og gæða í fjölsetrasamanburðarprófuninni.

Tafla 1

Ráðlögð viðmiðunarefni

	CAS-númer	Viðmiðunarefni	$\log P_{ow}$	pKa
1	78-93-3	2-bútanón (Metýletýlketón)	0,3	
2	1122-54-9	4-asetýlpýridín	0,5	
3	62-53-3	Anilín	0,9	
4	103-84-4	Asetanilíð	1,0	
5	100-51-6	Bensýlalkóhól	1,1	
6	150-76-5	4-metoxýfenól	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Fenoxýediksýra	1,4	pKa = 3,12

	CAS-númer	Viðmiðunarefni	log P _{ow}	pKa
8	108-95-2	Fenól	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dínítrófenól	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Bensónítríl	1,6	
11	140-29-4	Fenýlasetónítríl	1,6	
12	589-18-4	4-metýlbensýlalkóhól	1,6	
13	98-86-2	Asetófenón	1,7	
14	88-75-5	2-nítrófenól	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nítróbensósýra	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-klóránílín	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nítróbenzen	1,9	
18	104-54-1	Sínnamýlalkóhól (Sínnamínalkóhól)	1,9	
19	65-85-0	Bensósýra	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-kresól	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Sínnamínsýra	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 trans)
22	100-66-3	Anísól	2,1	
23	93-58-3	Metýlbensóat	2,1	
24	71-43-2	Bensen	2,1	
25	99-04-7	3-metýlbensósýra	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-klórifenól	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Tríklórétýlen	2,4	
28	1912-24-9	Atrasín	2,6	
29	93-89-0	Etýlbensóat	2,6	
30	1194-65-6	2,6-díklórbensónítríl	2,6	
31	535-80-8	3-klórbensósýra	2,7	pKa = 3,82

	CAS-númer	Viðmiðunarefni	log P _{ow}	pKa
32	108-88-3	Tólúen	2,7	
33	90-15-3	1-naftól	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-díklóránílín	2,8	
35	108-90-7	Klórbenzen	2,8	
36	1746-13-0	Allýlfenýleter	2,9	
37	108-86-1	Brómbenzen	3,0	
38	100-41-4	Etýlbenzen	3,2	
39	119-61-9	Bensófenón	3,2	
40	92-69-3	4-fenýlfenól	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Þýmól	3,3	
42	106-46-7	1,4-díklórbenzen	3,4	
43	122-39-4	Dífenýlamín	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalín	3,6	
45	93-99-2	Fenýlbensóat	3,6	
46	98-82-8	Ísóprópýlbenzen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-tríklórphenól	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bífenýl	4,0	
49	120-51-4	Bensýlbensóat	4,0	
50	88-85-7	2,4-dínítró-6-sek-bútýlfenól	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-tríklórbenzen	4,2	
52	143-07-7	Dódekansýra	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Dífenýleter	4,2	
54	85-01-8	Fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-bútýlbenzen	4,6	

	CAS-númer	Viðmiðunarefni	log P _{ow}	pKa
56	103-29-7	Díbensýl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-dífenýlpýridín	4,9	
58	206-44-0	Flúoranten	5,1	
59	603-34-9	Trífenýlamín	5,7	
60	50-29-3	DDT (díklórdífenýltríklóretan (e. <i>dichloro diphenyl trichloroethane</i>))	6,5	

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Bráðabirgðamat á deilistuðlinum

16. Ef slíkt er nauðsynlegt má meta deilistuðul prófunarefnis, helst með reikniaðferð (sjá viðbæti) eða, þegar við á, með því að nota hlutfallið milli leysni prófunarefnisins í hreinu leysunum.

Búnaður

17. Nota þarf vöskvalitskilju (e. *liquid-phase chromatograph*) með sláttarlausri dælu og hentugu skynjarakerfi. Unnt er að nota ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós með 210 nm bylgjulengd eða brotstuðulsnema fyrir marga mismunandi íðefnaflokkka. Ef skautaðir hópar eru í stöðufasanum getur það rýrt mjög afkastagetu háþrýstivöskiljunarsúlunnar. Þess vegna skal hlutfall skautaðra hópa í stöðufasanum vera sem lægst (16. heimild). Nota má öragna þökkunarefni með óskautuðum stöðufasa eða tilbúna, pakkaðar súlur sem fást á almennum markaði. Setja má forsúlu úr sama efni milli inngjafarkerfisins og greiningarsúlunnar.

Ferðafasi:

18. Notað er metanól fyrir háþrýstivöskiljun og eimað eða afjónað vatn til að útbúa skolleysinn sem er afgasaður fyrir notkun. Við skolun skal nota fastan ferðafasa. Í metanól-vatnsblöndunni skulu að lágmarki vera 25% af vatni. Venjulega er fullnægjandi að nota blöndu af metanóli og vatni í rúmmálshlutföllunum 3:1 til að skola efni með log P 6 út á innan við klukkustund við rennslis hraðann 1 ml/mín. Þegar um er að ræða efni með log P-gildi yfir 6 getur verið nauðsynlegt að stytta skoltímann (einnig fyrir viðmiðunarefni) með því að minnka skautun ferðafasans eða nota styttri súlu.
19. Prófunar- og viðmiðunarefni verða að vera leysanleg í ferðafasanum í nægum styrkleika til að unnt sé að greina þau. Íblöndunarefni má aðeins í undantekningartilvikum setja í metanól-vatnsblönduna þar eð þau breyta eiginleikum súlunnar. Í þessum tilvikum verður að vera staðfest að rástími prófunar- og viðmiðunarefna hafi ekki orðið fyrir áhrifum. Ef blanda af metanóli og vatni hentar ekki má nota aðrar blöndur af lífrænum leysum og vatni, t.d. etanól og vatn eða asetónítril og vatn eða ísóprópylalkóhól (2-própanól) og vatn.
20. Þegar um er að ræða jónanleg efni er sýrustig skiljuvökvans afar mikilvægt. Það skal vera innan pH-vinnusviðs súlunnar, að jafnaði milli 2–8. Ráðlegt er að nota jöfnun. Fara skal varlega til að komast hjá saltútfellingum og skemmdum á súlnni sem geta orðið þegar notaðar eru tiltekna blöndur af lífrænum fösum og jafnalausnum. Almennt er ekki ráðlegt að gera mælingar með háþrýstivöskiljun með stöðufösum úr kísli við hærri pH-gildi en 8 þar eð basiskur ferðafasi getur dregið hratt úr afkastagetu súlunnar.

Uppleyst efni

21. Prófunar- og viðmiðunarefni verða að vera nægilega hrein til að tengja toppana í skiljuritunum við viðkomandi efni. Efni, sem nota skal við prófun eða kvörðun, eru leyst upp í ferðafasanum ef þess er kostur. Ef annar leysir en ferðafasinn er notaður til að leysa upp prófunar- og viðmiðunarefni skal nota ferðafasann fyrir endanlega þynningu áður en innsprautun fer fram.

Prófunarskýrði

22. Hitastig má ekki sveiflast meira en ± 1 °C meðan á mælingunni stendur.

Ákvörðun á súlutíma t_0

23. Unnt er að mæla súlutímann t_0 með því nota lífræn efni sem ekki sitja eftir (t.d. þjóúrea eða formamið). Unnt er leiða nákvæmari súlutíma af mældum rástíma eða safni u.þ.b. sjö efna úr raðkvæmaröð (t.d. n-alkýlmetýlketón) (17. heimild). Rástímar $t_R (n_C + 1)$ eru settir fram á línuriti á móti $t_R (n_C)$ þar sem n_C er fjöldi kolefnisatóma. Fengin er bein lína $t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 - A)t_0$ þar sem A, sem stendur fyrir $k(n_C + 1)/k(n_C)$, er fasti. Súlutíminn t_0 er fenginn með skurðpunkti $(1 - A)t_0$ og hallatölu A.

Aðhvarfsjafna

24. Næsta þrep er að setja fram á línuriti fylgni $\log k$ á móti $\log P$ fyrir viðeigandi viðmiðunarefni þar sem $\log P$ -gildin liggja nærri gildinu sem vænst er fyrir prófunarefnið. Í reynd er 6 til 10 viðmiðunarefnum sprautað inn samtímis. Rástímar eru ákvarðaðir, helst með tegrunarrita sem er tengdur skynjarakerfinu. Samsvarandi lograr af rýmdarstuðlum $\log k$ eru settir fram á línuriti sem fall af $\log P$. Aðhvarfsjafnan er notuð með reglulegu millibili, a.m.k. einu sinni á dag, svo að hægt sé að fylgjast með mögulegum breytingum á afkastagetu súlunnar.

ÁKVÖRÐUN Á P_{ow} PRÓFUNAREFNISINS

25. Prófunarefninu er sprautað inn í smæsta greinanlega magni. Rástíminn er tvíákværðaður. Deilistuðull prófunarefnisins er fenginn með því að innreikna reiknaða rýmdarstuðulinn á kvörðunargrafinu. Ef deilistuðullinn er mjög lágur eða mjög hár er nauðsynlegt að framreikna. Í þessum tilvikum er sérstaklega mikilvægt að gæta að öryggismörkum aðhvarfslínunnar. Ef rástími sýnis fellur utan rástímabilanna, sem fengin eru fyrir staðlana, skal gefa upp viðmiðunarmörk.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**Prófunarskýrsla**

26. Eftirfarandi skal koma fram í skýrslunni:
- bráðabirgðamat á deilistuðlinum, ef það var ákvarðað, áætluð gildi og aðferðin sem notuð var; ef notuð var útreikningsaðferð, ítarleg lýsing á henni, þ.m.t. auðkenning á gagnagrunninum og ítarlegar upplýsingar um val á sameindarbrotum,
 - prófunar- og viðmiðunarefni: hreinleiki, byggingarformúla og CAS-númer,
 - lýsing á búnaði og prófunarskýrðum: greiningarsúla, forsúla,
 - ferðafasi, greiniaðferðir, hitasvið, sýrustig,
 - skolonarrit (skiljurit),
 - súlutími og hvernig hann var mældur,
 - mæligildi rástíma og $\log P_{ow}$ -gildi úr heimildum fyrir viðmiðunarefni sem notuð eru til kvörðunar,
 - nákvæmar upplýsingar um bestu aðhvarfslínu ($\log k$ á móti $\log P_{ow}$) og fylgnistuðull línunnar, þ.m.t. öryggisbil,
 - meðalmæligildi rástíma og innreiknað $\log P_{ow}$ -gildi fyrir prófunarefnið,
 - ef um blöndu er að ræða: skiljurit fyrir skolonarrit með tilgreindum þröskuldsgildum,

- $\log P_{ow}$ -gildi sem tengjast svæði í % á $\log P_{ow}$ -toppnum,
- útreikningur með aðhvarfslínu,
- reiknað vegið meðaltal $\log P_{ow}$ -gilda, þegar við á.

HEIMILDIR

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

- 15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.
 - 16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1000 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. Inczedy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromato.* 3, 1669.
-

Viðbætur

Reikniaðferðir fyrir P_{ow}

INNGANGUR

1. Í þessum viðbæti er stutt kynning á því hvernig P_{ow} er reiknað. Frekari upplýsingar fyrir lesandann er að finna í kennslubókum (1.–2. heimild).
2. Reiknuð P_{ow} -gildi eru notuð til að:
 - ákveða hvaða tilraunaaðferð skal nota: hristiflöskuaðferð fyrir $\log P_{ow}$ milli –2 og 4 og háþrýstivökvaskiljun fyrir $\log P_{ow}$ milli 0 og 6,
 - velja skilyrði sem nota skal við háþrýstivökvaskiljun (viðmiðunarefni, hlutfall metanóls/vatns),
 - athuga áreiðanleika gilda sem fengin eru með tilraunaaðferðum,
 - setja fram mat þegar ekki er unnt að beita tilraunaaðferðum.

Meginreglan að baki reikniaðferðum

3. Reikniaðferðirnar, sem hér eru lagðar til byggjast allar á fræðilegu niðurbroti sameindarinnar í heppilega byggingarhluta sem hafa þekkt og áreiðanleg, stigvaxandi $\log P_{ow}$ -gildi. Gildi $\log P_{ow}$ er fengið með því að leggja saman sameindabrotsgildin og leiðréttingarliði fyrir víxlverkanir innan sameindar. Skrár yfir sameindabrotsfasta og leiðréttingarliði eru tiltækar (1.–6. heimild). Sumar þeirra eru uppfærðar reglulega (3. heimild).

Áreiðanleiki reiknaðra gilda

4. Almennt minnkar áreiðanleiki reikniaðferðanna eftir því sem efnið, sem verið er að rannsaka, er flóknara. Ef um er að ræða einfaldar sameindir með litla sameindabygnd og einn eða tvo virka hópa má gera ráð fyrir fráviki, sem nemur 0,1–0,3 $\log P_{ow}$ -einingum, milli niðurstaðna úr mismunandi niðurbrotsaðferðum og mældra gilda fyrir $\log P_{ow}$. Hver skekkjumörkin eru fer eftir áreiðanleika þeirra niðurbrotsfasta sem eru notaðir, hvort unnt er að greina víxlverkanir innan sameinda (t.d. vetnistengi) og rétttri notkun leiðréttingarliða. Ef um er að ræða jónandi efni verður að taka tillit til hleðslu jónunar og umfangs hennar.

 π -aðferð Fujita-Hansch

5. Upprunalegi fastinn fyrir vatnsfælna sethópa, π , sem Fujira o.fl. settu fram (7. heimild) er skilgreindur sem hér segir:

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

þar sem PhX er arómatísk afleiða og PhH móðurefnið.

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

π -aðferðin skiptir fyrst og fremst máli ef um er að ræða arómatísk efni. π -gildi eru tiltæk fyrir mikinn fjölda sethópa (4.–5. heimild).

Aðferð Rekkers

6. Með Rekker-aðferðinni (8. heimild) er $\log P_{ow}$ -gildið reiknað á eftirfarandi hátt:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_{fi} + \sum_j (\text{víxlverkunarliðir})$$

þar sem a_i stendur fyrir fjölda skipta sem tiltekið sameindarbrót kemur fyrir í sameind og f_i stendur fyrir stigvaxandi log P_{ow} -gildi sameindarbrotsins. Vixlverkunarliðina má rita sem heilt margfeldi af aðeins einum fasta, C_m (svokölluðum töfrasta (e. *magic constant*). Sameindarbrotsfastarnir f_i og C_m voru ákvarðaðir eftir skrá yfir 1054 P_{ow} -gildi úr tilraunum með 825 efnum þar sem notuð var fjölbreytuaðhvarfsgreining (6. og 8. heimild). Vixlverkunarliðirnir eru ákvarðaðir í samræmi við tilteknar reglur (6., og 8.–9. heimild).

Aðferð Hansch-Leo

7. Með Hansch-Leo-aðferðinni (4. heimild) er log P_{ow} -gildið reiknað á eftirfarandi hátt:

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

þar sem f_i stendur fyrir niðurbrotsfasta, F_j fyrir leiðréttingarlið (stuðul), a_i og b_j fyrir samsvarandi tíðni atburða. Skrár yfir gildi sameindarbrotu frumeinda og yfir leiðréttingarliði F_j voru gerðar með endurteknum prófunum á grundvelli P_{ow} -gilda úr tilraunum. Leiðréttingarliðunum hefur verið skipt í nokkra mismunandi flokka (1. og 4. heimild). Þróaðir hafa verið hugbúnaðarpakkar til að taka tillit til allra reglna og leiðréttingarliða (3. heimild).

SAMSETT AÐFERÐ

8. Unnt er að bæta mjög útreikning á log P_{ow} -gildum fyrir flóknar sameindir ef sameindinni er skipt í stærri byggingarluta með áreiðanleg og tiltæk log P_{ow} -gildi, annaðhvort fengin úr töflum (3.–4. heimild) eða úr fyrirbyggjandi mælingum. Slík brót (t.d. heturhringasambönd, antrakinón, asóbensen) er síðan hægt að leggja saman með π -gildum Hansch eða með sameindarbrotsföstum Rekkers eða Leos.

Athugasemdir:

- i. Reikniaðferðirnar eiga einungis við um efni sem, eru jónuð að einhverju eða öllu leyti, ef tekið er tillit til nauðsynlegra leiðréttingarstuðla.
- ii. Ef gera má ráð fyrir að vetnistengi séu til staðar innan sameinda verður að bæta við samsvarandi leiðréttingarliðum (u.þ.b. + 0,6 til + 1,0 log P_{ow} -einingum) (1. heimild). Þrívíddarlíkön eða gögn úr litrófsgreiningum geta gefið vísbindingar um að slík tengi sé þar að finna.
- iii. Ef mismunandi ráphverfur koma til greina skal nota líklegustu myndina sem grundvöll útreiknings.
- iv. Fylgjast skal vel með endurskoðunum á skráum yfir sameindarbrotsfastana.

HEIMILDIR UM REIKNIAÐFERÐIR

- 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. 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 1000 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, Pharmacology 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) Í stað kafla C.3 komi eftirfarandi:

„C.3. VAXTARHINDRUNARPRÓFUN Á FERSKVATNSÞÖRUNGUM OG BLÁBAKTERÍUM

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunareglu 201 um prófanir (2006, viðauki leiðréttur 2011). Komið hefur í ljós þörf á að rýmka prófunaraðferðina til að hún nái til fleiri tegunda og uppfæra hana til að uppfylla kröfur um hættumat og flokkun á iðefnum. Þessi endurskoðun hefur verið framkvæmd á grundvelli víðtækrar fenginnar reynslu, vísindalegra framfara á sviði rannsókna á eiturhrifum í þörungum og víðtækri notkun prófunaraðferðarinnar í samræmi við reglur síðan hún var upphaflega samþykkt.
2. Skilgreiningar sem eru notaðar eru gefnar upp í 1. viðbæti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

3. Tilgangurinn með þessari prófun er að ákvarða áhrif iðefnis á vöxt smásærra þörungna í ferskvatni og/eða blábaktería. Prófunarlífverur í veldisvexti eru látnar verða fyrir váhrifum af prófunariðefninu í loturækt, yfirleitt í 72 klukkustundir. Þrátt fyrir tiltölulega stuttan prófunartíma er hægt að meta áhrifin yfir nokkrar kynslóðir.
4. Svörun prófunarkerfisins er sú að það dregur úr vexti þörungna í röð rækta (prófunareiningunum) sem eru látnar verða fyrir váhrifum af mismiklum styrk prófunariðefnis. Svörunin er metin sem fall af styrk váhrifanna í samanburði við meðalvöxt samhliða samanburðarrækta sem eru ekki látnar verða fyrir váhrifunum. Til þess að prófunarkerfið geti sýnt fulla svörun við eiturhrifum (mesta næmi) eru ræktirnar látnar vaxa óhindrað í veldisvexti, með nægri næringu og samfelldri birtu, í nægilega langan tíma til að hægt sé að mæla hve mikið dregur úr sértæka vaxtarhraðanum.
5. Vöxtur og vaxtarhindrun eru ákvörðuð magnbundið með mælingum á lífmassa þörunganna sem fall af tíma. Lífmassi þörungna er skilgreindur sem þurrvigt í ákveðnu magni, t.d. mg af þörungum/litra prófunarlausnar. Erfitt er þó að mæla þurrvigt og því eru staðgengils-mælipættir notaðir. Af þeim staðgenglum er frumufjöldinn oftast notaður. Aðrir staðgengils-mælipættir eru m.a. frumurúmmál, flúrljómun, ljóspéttni o.s.frv. Breytistuðull til að umreikna mældu staðgengils-mælipáttinn yfir í lífmassa skal vera þekktur.
6. Endapunktur prófunarinnar er vaxtarhindrun, gefin upp sem logruð aukning lífmassa (meðaltal sértæks vaxtarhraða) meðan á váhrifatímabilinu stendur. Styrkurinn, sem veldur sértækri x% vaxtarhindrun (t.d. 50%), er ákvarðaður út frá meðaltali sértæks vaxtarhraða ræktaraða í próflausnum, sem skráður var, og er gefinn upp sem E_xC_x (t.d. E_xC_{50}).
7. Í sumum löndum þarf einnig að nota svarbreytuna „afrakstur“ í þessari prófunaraðferð til að uppfylla sérstakar eftirlitskröfur. Hún er skilgreind sem lífmassi við lok váhrifatímabilsins að frádrögnum lífmassa við upphaf váhrifatímabilsins. Styrkurinn sem veldur sértækri x% afraksturshindrun (t.d. 50%) er reiknaður út frá skráðum afrakstri í röð prófunarlausna og gefinn upp sem E_yC_x (t.d. E_yC_{50}).

8. Auk þess má ákvarða tölfræðilega minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

9. Upplýsingar um prófunaríðefnið, sem geta verið gagnlegar við ákvörðun á skilyrðum í prófuninni, eru m.a. byggingarformúla, hreinleiki, stöðugleiki í ljósi, stöðugleiki við prófunarskilyrðin, ljósgleypni, pK_a og niðurstöður prófana á umbreytingu, þ.m.t. lífbrjótanleiki í vatni.
10. Vatnsleysni, deilistuðull fyrir oktanól/vatn (P_{ow}) og gufuþrýstingur prófunarefnisins skulu vera þekkt og til skal vera fullgilt aðferð til magnákvörðunar íðefnisins í prófunarlausnunum með tilgreinda endurheimtargetu og greiningarmörk.

GILDI PRÓFUNARINNAR

11. Til að prófunin teljist gild skal hún uppfylla eftirfarandi nothæfisviðmiðanir:
 - Lífmassinn í samanburðarrækt skal sýna veldisaukningu um stuðul sem er minnst 16 innan 72 klst. prófunartímabils. Það samsvarar því að sértækur vaxtarhraði sé $0,92 \text{ dag}^{-1}$. Vaxtarhraðinn er yfirleitt verulega meiri hjá þeim tegundunum sem mest eru notaðar (sjá 2. viðbæti). Þessi viðmiðun næst ekki alltaf þegar notaðar eru tegundir sem vaxa hægar en þær sem skráðar eru í 2. viðbæti. Í því tilviki skal framlengja prófunartímabilið svo að náist a.m.k. sextánfaldur vöxtur í samanburðarræktum og þarf að vera veldisvöxtur allt prófunartímabilið. Styttu má prófunartímabilið í a.m.k. 48 klst. til að viðhalda óheftum veldisvexti meðan á prófuninni stendur, að því tilskildu að margföldunarstuðull að lágmarki 16 náist.
 - Meðalfrávíksstuðull fyrir sértækan vaxtarhraða, þrep fyrir þrep (dagar 0–1, 1–2 og 2–3 fyrir 72 klst. prófanir), í samanburðarræktum (sjá 1. viðbæti, „frávíksstuðull“) má ekki vera yfir 35%. Sjá 49. lið um útreikning á sértækum vaxtarhraða, þrep fyrir þrep. Þessi viðmiðun gildir um meðalgildi frávíksstuðla sem eru reiknaðir fyrir samhliða samanburðarræktir.
 - Meðan á prófunartímabilinu stendur skal frávíksstuðullinn fyrir meðaltal sértæks vaxtarhraða í samhliða samanburðarræktum ekki fara yfir 7% í prófunum með *Pseudokirchneriella subcapitata* og *Desmodesmus subspicatus*. Fyrir aðrar tegundir, sem eru sjaldnar prófaðar, skal gildið ekki fara yfir 10%.

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

12. Nota má viðmiðunariðefni, s.s. 3,5-díklórfenól sem er notað í alþjóðlegu hringprófuninni (1. heimild), til effirlits með prófunarferlinu. Líka má nota kalíumdíkrómat sem viðmiðunariðefni fyrir grænþörungna. Æskilegt er að prófa viðmiðunariðefni a.m.k. tvisvar sinnum á ári.

NOTKUNARVIÐ PRÓFUNARINNAR

13. Þessa prófunaraðferð er auðveldast að nota með vatnsleysnum íðefnum sem líklegt er að verði eftir í vatninu við prófunaraðstæður. Hugsanlega þarf að gera ákveðnar breytingar á aðferðinni sem lýst er (t.d. með lokuðu kerfi, undirbúningi prófunariláta) vegna prófunar á íðefnum sem eru rokgjörn, mjög ásogandi, lituð, torleysanleg í vatni eða íðefnum sem gætu haft áhrif á framboð næringar- eða steinefna í prófunarætinu. Leiðbeiningar um viðeigandi breytingar eru gefnar í 2.–4. heimild.

LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Búnaður

14. Prófunarilát og annar búnaður sem kemst í snertingu við prófunarlausnirnar skulu eingöngu vera úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Þvo skal búnaðinn vandlega til að tryggja að hvorki lífræn né ólífræn aðskotaefni hafi áhrif á vöxt þörunganna eða samsetningu prófunarlausnanna.

15. Prófunarílátin eru yfirleitt glerflöskur sem eru nægilega stórar til að rúma rækt til mælinga meðan á prófuninni stendur ásamt nægilegri massatílfærslu af CO₂ úr andrúmsloftinu (sjá 30. lið). Taka þarf mið af því að rúmmál vökvans þarf að vera nægilegt fyrir ákvarðanir með greiningum (sjá 37. lið).
16. Auk þess getur verið þörf á eftirfarandi búnaði, að hluta eða öllu leyti:
- Ræktunarbúnaður: ráðlagt er að nota skáp eða klefa þar sem hægt er að halda völdu ræktunarhitastigi með nákvæmninni ± 2 °C.
 - Ljósælitalæki: mikilvægt er að taka mið af því að aðferðin, sem notuð er við mælingu á ljósstyrk, og sérstaklega gerð nemans (gleypisins) getur haft áhrif á mæligildið. Ákjósanlegt er að við mælingarnar sé notaður kúlulaga nemi (4 π) (sem nemur beint og endurspeglar ljós frá öllum hornum fyrir ofan og neðan mæliflötinn) eða 2 π nemi (sem nemur ljós frá öllum hornum fyrir ofan mæliflötinn).
 - Búnaður til ákvörðunar á lífmassa þörunga: Frumutalningu, sem er oftast notuð sem staðgengils mæliþáttur fyrir lífmassa þörunga, má gera með rafrænum agnateljara, smásjá með talningahólfi, eða frumuflæðisjá. Mæla má aðra staðgengla lífmassa með frumuflæðisjá, flúrskinsmæli, litrófsmæli eða litmælingu. Breytistuðull til að umreikna frumfjölda í þurrvigt er gagnlegur til útreikninga. Reynst getur nauðsynlegt að nota kúvettur sem hafa minnst 4 cm ljósgeisla til að fá gagnlegar mælingar með litrófsmæli þegar styrkur lífmassa er lágur.

Prófunarlífverur

17. Nota má nokkrar tegundir lausra, smásærra þörunga og blábaktería. Stofnarnir sem skráðir eru í 2. viðbæti hafa reynst hentugir þegar notað er prófunarferlið sem tilgreint er í þessari prófunaraðferð.
18. Tilgreina skal stofn og/eða uppruna ef aðrar tegundir eru notaðar. Staðfesta skal að hægt sé að viðhalda veldisvexti þörunganna, sem valdir eru til prófunarinnar, meðan á prófunartímabilinu stendur og við ríkjandi aðstæður.

Vaxtaræti:

19. Ráðlagt er að nota annað af tveimur vaxtarætum: OECD-, eða AAP-æti. Samsetning á þessum ætum er gefin upp í 3. viðbæti. Taka þarf mið af því að upphafsstyrki og jafnarýmd (sem stýrir hækkun á pH-gildi) ætanna tveggja eru ekki eins. Niðurstöður prófananna geta því verið mismunandi eftir því hvort ætið er notað, sérstaklega þegar prófuð eru jónandi íðefni.
20. Nauðsynlegt getur reynst að breyta vaxtarætunum í ákveðnum tilgangi, t.d. þegar prófaðir eru málmar og klóbíndlar eða þegar prófun er gerð við mismunandi sýrustig. Notkun á breyttu æti skal lýst ítarlega og hún rökstudd (3.–4. heimild).

Upphafsstyrkur lífmassa

21. Upphafsstyrkur lífmassa verður að vera sá sami í öllum prófunarræktum og nægilega lágur til að veldisvöxtur haldist allt ræktunartímabilið, án þess að hætta sé á næringarþurrð. Þurrvigt lífmassa skal ekki fara yfir 0,5 mg/l í upphafi. Ráðlagt er að nota eftirfarandi frumustyrk í upphafi:

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

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

Navicula pelliculosa 10^4 frumur/ml

Anabaena flos-aquae 10^4 frumur/ml

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

Styrkleiki prófunaríðefnisins

- Nota má niðurstöður skammtastærðaprófana til þess að ákvarða á hvaða styrkleikabili líklegt er að áhrif komi fram. Velja skal a.m.k. fimm styrkleika í jafnhlutfallaröðum með stuðli sem fer ekki yfir 3,2 fyrir endanlega prófun. Ef prófunaríðefni sýna flatan feril styrkháðrar svörunar getur hærri stuðull verið réttlæt看anlegur. Styrkleikaraðirnar skulu helst ná yfir styrkleikabil sem veldur 5–75% hindrun á vaxtarhraða þörunganna.

Samhliða prófanir og samanburðarprófanir

- Í tilhögun prófunarinnar skulu felast þrjár samhliða prófanir á hverjum prófunarstyrk. Ef ekki er þörf á ákvörðun þess styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif má breyta prófunaráætlun þannig að styrkleikastigum sé fjölgað og samhliða prófunum á hverju styrkleikastigi fækkað. Samhliða samanburðarprófanir verða að vera a.m.k. þrjár og æskilegast er að þær séu tvöfalt fleiri en samhliða prófanir fyrir hvern prófunarstyrk.
- Búa má til sérstakar prófunarlausnir til ákvarðana með greiningum á styrkleika prófunarefnanna (sjá 36. og 38. lið).
- Ef notaður er leysir til að leysa upp prófunaríðefnið skal gera ráð fyrir viðbótarsamanburðarsýnum með leysinum, við sama styrk og hann er notaður í prófunarræktunum, í tilhögun prófunarinnar.

Undirbúningur sáningarræktar

- Sáningarræktin er undirbúin í prófunarætinu 2–4 dögum áður en prófunin hefst svo hægt sé að laga þörungana að prófunarskilyrðunum og tryggja að þörungarnir séu í veldisvaxtarfasa þegar þeim er sáð í prófunarlausnirnar. Þörungalífsmassinn skal aðlagður þannig að veldisvöxtur verði ríkjandi í sáningarræktinni þar til prófunin hefst. Sáningarræktin er ræktuð við sömu skilyrði og prófunarræktirnar. Aukning lífmassa í sáningarræktum er mæld til að tryggja að vöxturinn sé innan eðlilegra marka fyrir prófunarstofninn við ræktunarskilyrðin. Dæmi um tilhögun þörungaræktar er lýst í 4. viðbæti. Til að koma í veg fyrir samstilltar frumskiptingar meðan á prófuninni stendur getur annað fjölgunarstig í sáningarræktinni verið nauðsynlegt.

Undirbúningur prófunarlausnanna

- Sami styrkur vaxtarætis og upphaflegs lífmassa af prófunarþörungum skal vera í öllum prófunarlausnunum. Prófunarlausnir með styrknum sem valinn hefur verið eru yfirleitt búnar til með því að blanda vaxtaræti og sáningarrækt við stofnlausn prófunaríðefnisins. Oftast eru stofnlausnir búnar til með því að leysa íðefnið upp í prófunarætinu.
- Nota má leysa, t.d. aseton, t-bútýlalkóhól og dímetýlformamíð, sem burðarefni til að bæta íðefnum, sem hafa litla vatnsleysni, við prófunarætið (2.–3. heimild). Styrkur leysisins skal ekki fara yfir 100 µl/l og skal bæta sama styrk af leysi í allar ræktirnar (þ.m.t. samanburðarræktirnar) í prófunarröðinni.

Ræktun

- Prófunarílátunum er lokað með töppum sem hleypa gegnum sig lofti. Ílátin eru hrist og sett í ræktunarbúnaðinn. Meðan á prófuninni stendur er nauðsynlegt að halda þörungunum á svifi og að auðvelda flutning CO₂. Í þessu skyni skal stöðugt hrista þá eða hræra í þeim. Halda skal ræktum við hita á bilinu 21 til 24 °C með nákvæmni ± 2 °C. Hærra hitastig getur hentað betur fyrir aðrar tegundir en þær sem skráðar eru í 2. viðbæti, t.d. hitabeltistegundir, svo fremi sem hægt er að uppfylla gildisviðmiðanir. Ráðlagt er að setja flöskurnar handahófskennt í ræktunarkassann og skipta um staðsetningu á þeim daglega.
- pH-gildi samanburðarræktarinnar skal ekki hækka meira en sem nemur 1,5 einingum meðan á prófun stendur. Til að samanburðarnákvæmar og vel skilgreindar niðurstöður náist getur verið nauðsynlegt að takmarka pH-rekið fyrir málma og íðefni sem jónast að hluta til við pH-gildi sem er nærri pH prófunarinnar. Tæknilega mögulegt er að ná reki sem er < 0,5 pH-einingar með því að tryggja fullnægjandi massafærslu CO₂ úr loftinu umhverfis í prófunarlausnina, t.d. með því að auka hraðann á hristingnum. Einnig er hægt að draga úr þörfinni á CO₂ með því að draga úr lífmassanum í upphafi eða stytta prófunartímabilið.

31. Flöturinn þar sem ræktunin fer fram skal fá samfellda, jafna flúrlýsingu, t.d. af gerðinni „köld, hvít“ eða „dagsljós“. Munur er á lýsingarþörf milli stofna þörunga og blábaktería. Velja skal ljósstyrkinn svo að hann henti prófunarlífverunni sem notuð er. Fyrir þær tegundir grænþörunga, sem ráðlagðar eru, skal valinn ljósstyrkur við yfirborð prófunarlausnarinnar á bilinu $60\text{--}120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ þegar hann er mældur á virku bylgjulengdarsviði ljóstillífunar, þ.e. $400\text{--}700 \text{ nm}$, með viðeigandi móttaka. Sumar tegundir, sérstaklega *Anabaena flos-aquae*, vaxa vel við minni ljósstyrk og meiri styrkur getur skaðað þær. Fyrir slíkar tegundir skal velja meðalljósstyrk á bilinu $40\text{--}60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. (Ef notuð eru ljósmælitæki sem eru kvörðuð í lúxum samsvarar sviðið fyrir kalt, hvítt ljós, $4440\text{--}8880 \text{ lúx}$, u.þ.b. ráðlagða ljósstyrknum $60\text{--}120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Ljósstyrknum er haldið innan við $\pm 15\%$ frá meðalljósstyrk yfir ræktunarsvæðinu.

Lengd prófunar

32. Prófunartíminn er yfirleitt 72 klukkustundir. Þó mega prófanir vara í lengri eða styttri tíma, að því tilskildu að hægt sé að uppfylla allar gildisviðmiðanir í lið 11.

Mælingar og ákvarðanir með greiningum

33. Þörungalífsmassinn í hverri flösku er ákvarðaður a.m.k. daglega á prófunartímabilinu. Ef mælingar eru gerðar á litlu magni, sem er tekið með pípettu úr prófunarlausninni, skal ekki bæta upp magnið.
34. Mælingar á lífmassa eru gerðar með handvirkri frumutalningu í smásjá eða með rafrænum agnateljara (frumutalning og/eða lífrúmmál). Nota má aðrar aðferðir, t.d. frumflæðissjárgreiningu, flúrljómun blaðgrænu í glasi eða í lífi (5.–6. heimild) eða ljóspéttni, ef hægt er að sýna fram á fullnægjandi fylgni við lífmassa á öllu gildissviði lífmassa sem fyrir kemur í prófuninni.
35. Mæla skal sýrustig lausnarinnar við upphaf og lok prófunarinnar.
36. Ef greiningarferli til ákvörðunar á prófunariðefninu á styrkleikabilinu sem er notað liggur fyrir skal greina prófunarlausnirnar til að staðfesta upphafsstyrkinn og að styrkur váhrifanna breytist ekki meðan á prófuninni stendur.
37. Ef þess er vænst að váhrifastyrkurinn breytist minna en 20% frá nafngildi meðan á prófuninni stendur getur verið nóg að greina styrk prófunariðefnisins við upphaf og lok prófunarinnar, auk styrks sem er nærri væntanlegu EC_{50} -gildi. Ef ólíklegt er að styrkurinn haldist innan 80–120% af nafnstyrk er ráðlagt að greina allan prófunarstyrk við upphaf og lok prófunarinnar. Til að skilgreina betur tap á prófunariðefnum þegar um rokgjörn, óstöðug eða mjög ásogandi prófunariðefni er að ræða er ráðlagt að taka viðbótarsýni á 24 klukkustunda fresti meðan á váhrifatímabilinu stendur. Ef til vill er þörf á samhliða prófunum aukalega fyrir þau íðefni. Í öllum tilvikum þarf aðeins að gera ákvörðun á styrk prófunariðefnis í einu íláti með samhliða prófun fyrir hvern prófunarstyrk (eða úr samsettu innihaldi ílátanna í samhliða prófuninni).
38. Meðhöndla skal prófunaræti, sem er búið til sérstaklega til greiningar á styrk váhrifa meðan á prófuninni stendur, á sama hátt og ætið sem notað er til prófunarinnar, þ.e. sá skal í það þörungum og það ræktað við sömu skilyrði. Ef greina þarf styrk uppleysta prófunariðefnisins getur verið nauðsynlegt að skilja þörungana frá ætinu. Æskilegt er að aðgreiningin fari fram í skilvindu við lítinn þyngdarkraft sem er nægilegur til að þörungarnir setjist til.
39. Ef unnt er að sýna fram á að styrkur prófunariðefnis í lausn hafi örugglega haldist innan markanna $\pm 20\%$ af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk í allri prófuninni er heimilt að greining á niðurstöðunum grundvallist hvort sem er á nafngildi eða mældu upphafsgildi. Ef frávik frá nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk er ekki innan styrkbilsins $\pm 20\%$ skal byggja greiningu á niðurstöðunum á faldmeðaltali styrks meðan á váhrifum stendur eða á líkönum sem lýsa lækku styrks prófunariðefnisins (3.–7. heimild).
40. Vaxtarhindrunarprófun á þörungum er kvikara prófunarkerfi en flestar aðrar stuttar vatnaeiturhrifaþrófanir. Af því leiðir að erfitt getur verið að skilgreina raunverulegan styrk váhrifa, sérstaklega fyrir ásogandi íðefni sem

eru prófuð við lágan styrkleika. Í þeim tilvikum er hvarf prófunariðefnisins úr lausninni vegna ásógunar vaxandi þörungalífmassans ekki til marks um að það sé glatað úr prófunarkerfinu. Þegar niðurstöður prófunarinnar eru greindar skal athuga hvort lækkun á styrk prófunariðefnisins meðan á prófuninni stendur fylgi minnkun á vaxtarhindrun. Ef svo reynist vera má taka til athugunar að nota viðeigandi líkan sem lýsir lækkuninni á styrk prófunariðefnisins (7. heimild). Ef svo reynist ekki vera gæti verið viðeigandi að byggja greininguna á niðurstöðunum um upphafsstyrkinn (nafnstyrk eða mældan styrk).

Aðrar athuganir

41. Við lok prófunarinnar skal gera smásjárskoðun til að staðfesta að útlit sáningarræktanna sé eðlilegt og heilbriggt og til að athuga hverskonar óeðlilegt útlit þörunganna (eins og gæti orsakast af snertingu við prófunariðefnið).

Markprófun

42. Við sumar aðstæður, t.d. ef forprófun bendir til þess að prófunariðefnið hafi engin eiturrhrif við styrk að 100 mg/l eða að leysnimörkum sínum í prófunarætinu (eftir því hvort er lægra) má gera markprófun með samanburði svörunar í samanburðarhópi og einum meðferðarhópi (100 mg/l eða styrkur sem er jafn leysnimörkun). Eindregið er mælt með að prófunin sé studd greiningu á styrk váhrifa. Öll prófunarskilyrði og gildisviðmiðanir, sem lýst hefur verið, eiga við um markprófun, að því undanteknu að fjöldi samhliða meðferðarprófana skal vera a.m.k. sex. Greina má svarbreytur samanburðar- og meðferðarhópanna með tölfræðiprófi til að bera saman meðaltöl, t.d. t-prófi. Ef dreifni hópanna tveggja er ekki jöfn skal gera t-próf sem er lagað að ójafnri dreifni.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Línurit vaxtarferla teiknað

43. Lífmassann í prófunarilátunum má gefa upp í einingum staðgengils mælipáttanna sem notaðir voru til mælinganna (t.d. frumufjöldi, flúrljómun).
44. Áætlaður styrkur lífmassa í prófunar- og samanburðarræktum er settur upp í töflu, ásamt styrk prófunarefnisins og mælingartímupunktum, skráðum í minnst heilum klukkustundum, til að teikna línurit vaxtarferlanna. Bæði lograkvarðar og línulegir kvarðar geta verið gagnlegir á þessu fyrsta stigi en lograkvarðar eru skyldubundnir og gefa yfirleitt betri mynd af breytileika í vaxtarmynstrum meðan á prófunartímabilinu stendur. Taka þarf mið af því að veldisvöxtur gefur beina línu þegar hann er teiknaður á lograkvarða og halli línunnar gefur til kynna hinn sértæka vaxtarhraða.
45. Línuritin eru notuð til að rannsaka hvort samanburðarræktirnar sýna veldisvöxt og áætlaðan vaxtarhraða allt prófunartímabilið. Rannsaka skal á gagnrýninn hátt alla gagnapunkta og útlit ferlanna og fara yfir mögulegar skekkjur í öðrum gögnum og aðferðum. Fara skal sérstaklega yfir gagnapunkta sem virðast sýna kerfisbundin frávik. Ef ljóst er að hægt er að greina mistök við tilhögun, og/eða ef taldar eru miklar líkur á þeim, er tiltekinn gagnapunktur merktur sem einfari og ekki tekinn með í tölfræðilegu greiningunni. (Ef þörungastyrkur mælist núll í helmingi eða einum þriðja íláta samhliða prófana getur það bent til þess að ekki hafi verið sáð rétt í ílátið eða það ekki þrifið nógu vandlega). Ástæður þess að gagnapunktur var talinn einfari og ekki tekinn með skulu teknar skýrt fram í prófunarskýrslunni. Eingöngu (sjaldgæf) mistök við tilhögun teljast gildar ástæður, ekki ónóg nákvæmni. Tölfræðilegar aðferðir til greiningar á einförum hafa takmarkað notagildi að því er varðar vandamál af þessum toga og koma ekki í stað sérfræðilíts. Æskilegt er að einfara séu merktir sem slíkir og hafðir með gagnapunktunum sem koma fram í allri síðari framsetningu gagna í myndrænu formi eða í töflum.

Svarbreytur

46. Tilgangurinn prófunarinnar er að ákvarða áhrif prófunariðefnisins á vöxt þörungna. Þar eð forgangsatíði og þarfir vegna eftirlits eru mismunandi eftir löndum er tveimur svarbreytum lýst í þessari prófunaraðferð. Áhrifin skulu metin með báðum svarbreytum, a) og b), sem lýst er hér á eftir, til þess að niðurstöður úr prófununum séu tækar í öllum löndunum.
 - a) Meðaltal sértæks vaxtarhraða: þessi svarbreyta er reiknuð út á grunni lograðrar aukningar lífmassans meðan á prófunartímabilinu stendur og er hún gefin upp fyrir hvern dag.
 - b) Afrakstur: þessi svarbreyta er lífmassinn við lok prófunarinnar að frádregnum lífmassanum í upphafi.

47. Tekið skal mið af því að gildin fyrir eiturrif, sem reiknuð eru út með þessum tveimur svarbreytum, eru ekki samanburðarhæf og þann mun þarf að hafa í huga þegar niðurstöður prófunarinnar eru notaðar. Vegna stærðfræðilegs grundvallar viðkomandi nálgana verða EC_x gildi, sem byggjast á meðaltali sértæks vaxtarhraða (E_rC_x), yfirleitt hærrí en niðurstöður sem byggðar eru á afrakstri (E_yC_x), ef prófunarskýlrdum þessarar prófunaraðferðar er fylgt. Það skal ekki túlkað sem munur á næmi svarbreytnanna tveggja, heldur einfaldlega þannig að gildin séu stærðfræðilega frábrugðin hvoru öðru. Hugtakið „meðaltal sértæks vaxtarhraða“ er byggt á almennu veldisvaxtarmynstri þörunga í ótakmarkaðri rækt þar sem eiturrif eru metin á grundvelli áhrifa þeirra á vaxtarhraða og eru ekki háð altæku gildi sértæks vaxtarhraða samanburðarræktarinnar, ferli styrkháðrar svörunar eða prófunartímabilinu. Niðurstöður byggðar á svarbreytunni „afrakstur“ eru á hinn bóginn háðar öllum þessum breytum. E_yC_x er háð sértækum vaxtarhraða þörungategundanna sem notaðar eru í hverri prófun og sértækum hámarksvaxtarhraða sem getur verið mismunandi milli tegunda og jafnvel mismunandi þörungastofna. Ekki skal nota þá svarbreytu til samanburðar á næmi fyrir eiturfnum meðal þörungategunda eða jafnvel mismunandi stofna. Þrátt fyrir að notkun meðaltals sértæks vaxtarhraða til að meta eiturrif sé vísindalega æskileg felur þessi prófunaraðferð einnig í sér mat á eiturrifum sem byggt er á afrakstri til að uppfylla nógildandi ákvæði laga og reglna í sumum landanna.

Meðalvaxtarhraði

48. Meðaltal sértæks vaxtarhraða fyrir tiltekið tímabil er reiknaður út sem logruð aukning lífmassa í hverju íláti með samanburðar- og meðferðarprófun með jöfnunni [1]:

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

þar sem:

μ_{i-j} er meðaltal sértæks vaxtarhraða frá tímanum i til j

X_i er lífmassinn við tíma i

X_j er lífmassinn við tíma j

Reiknað er út meðalgildi vaxtarhraða fyrir hvern meðferðar- og samanburðarhóp, ásamt dreifnimati.

49. Reiknað er út meðaltal sértæks vaxtarhraða fyrir allt prófunartímabilið (yfirleitt daga 0–3) og er nafngildi lífmassans sem sáð var notað sem byrjunargildi fremur en mælt byrjunargildi, vegna þess að þannig næst yfirleitt meiri nákvæmni. Ef búnaðurinn sem notaður er til mælinga á lífmassanum getur ákvarðað hinn litla lífmassa við sáningu af nægilegri nákvæmni (t.d. frumflæðissjá) er hægt að nota mældan byrjunarstyrk lífmassans. Einnig skal reiknaður út sértækur vaxtarhraði á hverjum degi meðan á prófuninni stendur (dagar 0–1, 1–2 og 2–3), hann mældur þrjú fyrir þrjú og rannsakað hvort vaxtarhraði í samanburðarræktum helst stöðugur (sjá gildisviðmiðanirnar í lið 11). Sértækur vaxtarhraði á fyrsta degi, sem er marktækt minni en sértækur heildarmeðalvaxtarhraði, getur bent til hægvahtarskeiðs. Þótt hægt sé að lágmarka, og nánast koma í veg fyrir, hægvahtarskeið í samanburðarræktum með hæfilegri fjölgun í forræktinni getur hægvahtarskeið í ræktunum sem verða fyrir váhrifum bent til bata eftir eiturlagið í upphafi eða minni váhrifa vegna taps á prófunariðefni (þ.m.t. vegna sogunar í þörungalífmassann) eftir upphafsváhrifin. Þess vegna er hægt að mæla vaxtarhraðann þrjú fyrir þrjú til að meta áhrif prófunariðefnisins á váhrifatímabilinu. Marktækur munur á vaxtarhraðanum þrjú fyrir þrjú og meðalvaxtarhraðanum bendir til frávíks frá stöðugum veldisvexti og því ástæða til að rannsaka vaxtarferlana nánar.

50. Hlutfall hindrunar á vaxtarhraða fyrir hverja samhlíða meðferðarprófun er reiknuð út með jöfnunni [2]:

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

þar sem:

$%I_r$ = hlutfall hindrunar í meðaltali sértæks vaxtarhraða

μ_c = meðalgildi fyrir meðaltal sértæks vaxtarhraða (μ) í samanburðarhópnum

μ_r = meðaltal sértæks vaxtarhraða fyrir samhliða meðferðarpröfun.

51. Ef notaðir eru leysar til að undirbúa prófunarlausnina skal nota samanburðarsýni með leysi til útreikninga á hlutfalli hindrunar fremur en samanburðarpröfun án leysis.

Afrakstur

52. Afrakstur er reiknaður út sem lífmassi við lok prófunarinnar að frádregnum upphaflegum lífmassa fyrir hvert ílát með samanburðar- og meðferðarsýni. Reiknað er út meðalgildi afraksturs ásamt dreifnimati fyrir hvern prófunarstyrk og samanburðarpröfun. Hægt er að reikna út hlutfall hindrunar á aftakstri ($%I_y$) fyrir hverja samhliða meðferðarpröfun með eftirfarandi hætti:

$$%I_y = \frac{Y_c - Y_r}{Y_c} \times 100 \quad [3],$$

þar sem:

$%I_y$ = hlutfall hindrunar á aftakstri

Y_c = er meðalgildi afraksturs í samanburðarhópnum

Y_r = er gildi afraksturs í samhliða meðferðarpröfunum.

Ferill styrkháðrar svörunar teiknaður

53. Ferill hindrunarprósentu sem fall af logra prófunariðfnisstyrksins er teiknaður og rannsakaður nákvæmlega án þess að gagnapunkturarnir, sem voru valdir sem einfarar í fyrsta hlutanum, séu hafðir með. Dregin er samfelld, besta lína gegnum gagnapunktana, frihendis eða með innreikningi í tölvu, til að fá mynd af sambandi styrks og svörunar, síðan með nákvæmari aðferð, helst tölfræðiaðferð í tölvu. Með hliðsjón af fyrirhugaðri notkun gagnanna, gæðum (nákvæmni) þeirra og magni sem og tiltækum búnaði til gagnagreiningar, mætti ákveða (og stundum eru góð rök fyrir því) að hætta gagnagreiningunni þegar hér er komið og lesa einfaldlega lykilstærðirnar EC_{50} og EC_{10} (og/eða EC_{20}) af handteiknaða ferlinum (sjá einnig kafla hér á eftir um örvandi áhrif). Meðal gilda ástæðna fyrir því að nota ekki tölfræðiaðferð eru:

- að gögnin séu ekki til þess fallin að áreiðanlegri niðurstöður fái st með tölvuvinnslu en með sérfræðialiti – í þeim tilvikum geta sum tölvuforrit jafnvel ekki gefið áreiðanlegar lausnir (ítrekanir eru ekki samleitnar o.s.frv.),
- að fyrirbyggjandi tölvuforrit ráði ekki nægilega vel við svaranir vegna vaxtarörvunar (sjá hér á eftir).

Tölfræðiaðferðir

54. Markmiðið er að fá fram meginlegt samband styrks og svörunar með aðhvarfsgreiningu. Hægt er að nota vegið línulegt aðhvarf þegar færsla svörunargagnanna hefur verið línugerð – t.d. probit- eða logit- eða Weibull-einingar (8. heimild), en ólínulegar aðhvarfsgreiningar eru æskilegri aðferðir sem ráða betur við óhjákvæmilegar misfellur í gögnum og frávik frá jafnri dreifingu. Nærri núlli, eða algerrri vaxtarhindrun, geta slíkar misfellur magnast við umbreytinguna og truflað greininguna (8. heimild). Tekið skal mið af því að stadalaðferðir við greiningu sem nota probit-, logit- eða Weibull-umbreytingar eru ætlaðar til notkunar á skammtabundnum gögnum (t.d. dánartíðni eða lifun) og þeim þarf að breyta til að þær nái yfir gögn um vöxt eða lífmassa. Sértækar aðferðir við ákvörðun á EC_x -gildum með samfelldum gögnum má finna í (9.–11. heimild). Notkun ólínulegrar aðhvarfsgreiningar er lýst ítarlegar í 5. viðbæti.

55. Nota skal feril styrks á móti svörum til útreikninga á punktmat EC_x-gilda fyrir allar svarbreytur sem þarf að greina. Ákvörðuð skulu 95% öryggismörk fyrir hvert mat, ef unnt er. Meta skal mátgæði gagna við aðhvarfslíkanið, annaðhvort myndrænt eða tölfræðilega. Gera skal aðhvarfsgreiningar með svörum hvernar samhlíða prófunar fyrir sig, ekki með meðaltali meðferðarhópa. Ef ferilaðlögun er erfið eða ómöguleg með ólínulegum gögnum vegna þess að þau eru of dreifð mætti sneiða hjá þeim vanda með því að gera aðhvarfsgreininguna á hópmeðaltali, sem er gagnleg aðferð til að draga úr áhrifum mögulegra einfara. Ef þessi lausn er notuð skal hún tilgreind í prófunarskýrslunni sem frávik frá venjulegri aðferð vegna þess að ekki fékkst góð ferilaðlögun með stökum samhlíða prófunum.
56. Einnig má fá mat á EC₅₀-gildum og öryggismörk með því að nota línulegan innreikning og nálgun með handahófsúrtökum (13. heimild) ef fyrirbyggjandi aðhvarfslíkön/-aðferðir henta ekki fyrir gögnin.
57. Nauðsynlegt er að bera saman meðaltal meðferðarprófana með dreifnigreiningu (ANOVA) til að fá mat á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif, og þar með styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif, og áhrifum prófunariðefnisins á vaxtarhraðann. Meðaltalið fyrir hvern styrkleika skal svo borið saman við meðaltal samanburðarins með viðeigandi aðferð þar sem notaður er margfaldur samanburður eða leitniþrófun. Prófanir Dunnetts eða Williams geta verið gagnlegar (12. og 14.–17. heimild). Nauðsynlegt er að meta hvort forsenda dreifnigreiningar um einsleitni dreifinnar stenst. Matið er hægt að framkvæma myndrænt eða með hefðbundinni þrófun (17. heimild). Prófanir Levens eða Bartlett's eru viðeigandi. Ef forsendan um einsleitni dreifni stenst ekki er stundum hægt að leiðrétta slíkt með lograðri umbreytingu gagnanna. Ef misleitni dreifinnar er mjög mikil, og ekki hægt að leiðrétta hana með umbreytingu, má taka til athugunar að gera greiningu með aðferðum eins og Jonkheere-leitniþrófun með stíglækkun. Ítarlegri leiðbeiningar um ákvörðun styrks, sem hefur engin merkjanleg áhrif, má finna í 11. heimild.
58. Vegna nýlegra framfara í vísindum er mælt með að hætt verði að nota hugtakið „styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif“ (NOEC) og nota í staðinn punktmat EC_x-gilda, byggt á aðhvarfi. Ekki er búið að fastsetja viðeigandi x-gildi fyrir þetta þörungaþróf. Á bilinu 10–20% virðist vera rétt svið (með hliðsjón af svarbreytunni sem valin er) og æskilegt er að bæði EC₁₀ og EC₂₀ séu tilgreind.

Vaxtarörvun

59. Vaxtarörvun (neikvæð hindrun) kemur stundum fram við lágan styrk. Þetta getur verið afleiðing tvífasa (eiturörvun) eða örvandi vaxtarþátta sem blandast við prófunarefnið í grunnætið sem er notað. Taka þarf mið af því að íblöndun ólífræna næringarefna ætti ekki hafa nein bein áhrif þar eð í prófunarætinu á að vera offramboð af næringarefnum meðan á prófuninni stendur. Yfirleitt þarf ekki að taka örvun við lágan styrk til greina við útreikninga EC₅₀, nema hún sé mjög mikil. Ef hún er mjög mikil, eða ef þarf að reikna út EC_x-gildi fyrir lágt x, gæti þó þurft að gera sérstakar ráðstafanir. Ekki skal fella svaranir við örvun brott úr gagnagreiningunni, ef hjá því verður komist, og ef fyrirbyggjandi ferilaðlögunarhugbúnaður samþykkir ekki minni háttar örvanir er hægt að nota línulegan innreikning og nálgun með handahófsúrtökum. Ef örvunin er mjög mikil má taka til athugunar að nota tvífasalíkan (18. heimild).

Vaxtarhindrun sem er ekki vegna eiturhrifa

60. Ljósgleypin prófunarefni geta dregið úr vaxtarhraða þar sem skygging dregur úr tiltæku ljósi. Eðlisræn áhrif af þessum toga skal skilja frá eiturhrifunum með því að breyta prófunarskilyrðunum og hið fyrra skal tilgreina sérstaklega. Leiðbeiningar er að finna í 2.–3. heimild.

PRÓFUNARSKÝRSLA

61. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunariðefni:

- eðlisástand og viðkomandi eðlisefnafræðilegir eiginleikar, þ.m.t. vatnsleysnimörk,
- gögn um efnafræðilega sanngreiningu (t.d. CAS-númer), þ.m.t. hreinleika (óhreinindi).

Prófunartegund:

- stofn, birgir eða uppruni og ræktunarskilyrðin sem notuð voru.

Prófunarskilyrði:

- upphafsdagur prófunarinnar og hve lengi hún stendur,
- lýsing á tilhögum prófunarinnar: prófunarílát, rúmmál rækta, þéttleiki lífmassa við upphaf prófunarinnar,
- samsetning ætisins,
- prófunarstyrkur og samhliða prófanir (t.d. fjöldi samhliða prófana, fjöldi styrkleika í prófunum og jafnhlutfallarunan sem er notuð),
- lýsing á því hvernig prófunarlausnir eru búnar til, þ.m.t. notkun leysa o.s.frv.,
- ræktunarbúnaður,
- ljósstyrkur og gæði (ljósgjafi, einsleitni),
- hitastig,
- styrkur sem prófaður er: nafngildi prófunarstyrks og allar niðurstöður úr greiningum til ákvörðunar á styrk prófunarefnisins í prófunarílátunum. Tilgreina skal endurheimtargetu aðferðarinnar og magngreiningarmörk í prófunarefniviðnum,
- öll frávik frá prófunaraðferðinni,
- aðferð notuð til ákvörðunar á lífmassa og vísbendingar um fylgni milli mældra mæliþátta og þurrvigtar,

Niðurstöður:

- pH-gildi við upphaf og lok allra meðferðarprófanna,
- lífmassi í hverri flösku við hvern mælipunkt og aðferð við mælingar lífmassa,
- vaxtarferlar (teiknaðir sem lífmassi á móti tíma),
- útreikningar á svarbreytum fyrir hverja samhliða meðferðarprófun, með meðalgildum og fráviksstuðli fyrir samhliða prófanir,
- myndræn útfærsla á sambandi styrks og áhrifa,
- mat á eiturhrifum fyrir svarbreytur, t.d. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, og viðkomandi öryggisbil. Minnsti styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif og styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif, ef þeir hafa verið reiknaðir út, og tölfræðiaðferðirnar sem notaðar voru til að ákvarða þá,
- ef notuð var dreifnigreining: umfang áhrifanna sem greindust (t.d. minnsti marktækur munur),
- öll vaxtarörvun sem fram kom í öllum meðferðarprófunum,
- öll önnur áhrif sem greindust, t.d. formfræðilegar breytingar þörunganna,
- umfjöllun um niðurstöðurnar, þ.m.t. öll áhrif sem frávik frá prófunaraðferðinni hafa á niðurstöðu prófunarinnar.

HEIMILDIR

- 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 phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22: 919-925
 - 7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.
 - 8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19: 713-718.
 - 9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.
 - 10) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485-1494.
 - 11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. 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.
-

*I. viðbætur***Skilgreiningar**

Eftirfarandi skilgreiningar og skammstafanir eru notaðar í þessari prófunaraðferð:

Lífmassi er þurrvigt lifandi efnis í stofni, gefin upp í ákvæðnu magni, t.d. mg af þörungum/lítra prófunarlausnar. Yfirleitt er „lífmassi“ skilgreindur sem massi en í þessari prófun vísar heitið til massa í tilteknu rúmmáli. Í þessari prófun eru líka oft mældir staðgenglar fyrir lífmassann, s.s. frumufjöldi, flúrljómun o.s.frv., og notkun hugtaksins „lífmassi“ vísar því líka til þessara staðgöngumælinga.

Íðefni er efni eða blanda

Frávíksstuðull er víddarlaus mæling á breytileika mælipáttar, skilgreind sem hlutfallið á milli staðalfrávíksins og meðaltalsins. Hann má líka gefa upp sem hundraðshlutaástandi. Meðalgildi frávíksstuðuls fyrir meðaltal sértæks vaxtarhraða í samhliða samanburðarræktum skal reiknað út með eftirfarandi hætti:

1. Hundraðshlutfall frávíksstuðuls fyrir meðaltal sértæks vaxtarhraða er reiknað út frá daglegum vaxtarhraða, sem er mældur þrep fyrir þrep, fyrir viðkomandi samhliða samanburðarrækt.
2. Reiknað er meðalgildi allra gildanna sem reiknuð voru samkvæmt 1. lið til að fá meðalgildi frávíksstuðuls fyrir daglegan, sértækan vaxtarhraða, þrep fyrir þrep, í samhliða samanburðarræktum.

EC_x er sá styrkur prófunariðefnisins, sem er uppleyst í prófunarætinu, sem veldur x% (t.d. 50%) samdrætti í vexti hjá prófunarlífverunni á tilgreindu váhrifatímabili (frávik frá fullum eða eðlilegum prófunartíma skulu tekin fram með skýrum hætti). Til ótvíræðrar merkingar á EC-gildum sem leidd eru út af vaxtarhraða eða afrakstri er táknið „E_xC“ notað fyrir vaxtarhraða og „E_yC“ er notað fyrir afrakstur.

Vaxtaræti er tilbúna ræktunarætið í heild sinni og í því vaxa þörungarnir meðan þeir komast í snertingu við prófunariðefnið. Yfirleitt er prófunariðefnið uppleyst í prófunarætinu.

Vaxtarhraði (meðaltal sértæks vaxtarhraða) er logruð aukning á lífmassa meðan á váhrifatímabilinu stendur.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) er minnsti styrkur þar sem íðefnið reynist, innan tilgreinds váhrifatímabils, draga úr vexti á tölfræðilega marktækan hátt (við $p < 0,05$) miðað við samanburðarhóp. Í öllum prófunum, þar sem styrkur er meiri en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif, skal hann á hinn bóginn valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum, merkjanlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Sé ekki hægt að uppfylla þessi tvö skilyrði skal skýra til fulls hvernig staðið var að vali á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (og þar með vali á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif).

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif er sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif.

Svarbreyta er breyta sem er notuð til að meta eiturhrif og er leidd út af öllum mældum mælipáttum sem lýsa lífmassa með mismunandi reikniðaðferðum. Með þessari prófunaraðferð eru vaxtarhraði og afrakstur svarbreytur sem eru leiddar út af beinum mælingum á lífmassa, eða á einhverjum af staðgenglum sem nefndir eru.

Sértækur vaxtarhraði er svarbreyta, skilgreind sem hlutfall mismunarins á náttúrulegum logra mælipáttarins sem í athugun er (í þessari prófunaraðferð: lífmassi) og viðkomandi tímabils.

Prófunariðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Afrakstur er gildi mælibreytu við lok váhrifatímabilsins að frádregnu gildi mælibreytunnar við upphaf váhrifatímabilsins og lýsir aukningu lífmassa meðan á prófun stendur.

2. viðbætur

Stofnar sem hafa reynst hentugir í prófunina**Grænpörungar**

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

Desmodesmus subspicatus (áður *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Kísilpörungar

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Blábakteríur

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

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Uppruni stofna

Stofnarnir sem mælt er með eru til sem einþörungsræktir úr eftirfarandi söfnum (í stafrófsröð):

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

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

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

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

Útlit og eiginleikar tegundanna sem mælt er með

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Útlit	Sigðlaga, undnar, stakar frumur	Egglaða, oftast stakar frumur	Staflaga	Keðjur egglaða frumna	Staflaga
Stærð (lengd × breidd) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Rúmmál (µm ³ /frumu)	40–60 ⁽¹⁾	60–80 ⁽¹⁾	40–50 ⁽¹⁾	30–40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Þurrvígt (mg/frumu)	2–3 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	1–2 × 10 ⁻⁸	2–3 × 10 ⁻⁹
Vaxtarhraði ⁽³⁾ (dagur ⁻¹)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

⁽¹⁾ Mælt með rafrænum agnateljara

⁽²⁾ Reiknað út frá stærð

⁽³⁾ Algengasti vaxtarhraði í OECD-æti við ljósstyrk sem er u.þ.b. 70 µE m⁻² s⁻¹ og 21 °C

Sérstakar ráðleggingar um ræktun og meðhöndlun prófunartegunda sem mælt er með

Pseudokirchneriella subcapitata og *Desmodesmus subspicatus*

Þessum grænþörungum er yfirleitt auðvelt að viðhalda í margskonar ræktunaræti. Upplýsingar um hentugt æti eru fáanlegar hjá stofnasöfnum. Frumurnar eru yfirleitt stakar og auðvelt að gera mælingar á frumupéttleika með rafrænum agnateljara eða smásjá.

Anabaena flos-aquae

Nota má margskonar æti til að viðhalda stofnrækt. Það er mjög mikilvægt að loturæktin fari ekki fram yfir veldisvaxtarfasa þegar hún er endurnýjuð því erfitt er að endurheimta hann þegar þar er komið.

Anabaena flos-aquae myndar frumukeðjur í þyrpingum. Stærð þyrpinganna getur verið mismunandi eftir ræktunarskilyrðum. Þegar ákvörðun á lífmassa er gerð með smásjártalningu eða rafrænum agnateljara getur verið nauðsynlegt að sundra þyrpingunum.

Nota má hátiðnihljóðsundrun á undirsýnum til að sundra keðjunum og draga úr breytileika talningar. Ef hátiðnihljóðsundrunin er lengri en þarf til að sundra keðjum og stytta þær getur það eyðilagt frumurnar. Nota þarf sama sundrunarstyrk og sundrunarlengd fyrir hverja meðferðarprófun.

Telja þarf nægilega mörg svæði á rauðkornateljaraum (mínst 400 frumur) til að vega upp á móti breytileikanum. Það eykur áreiðanleika þéttleikaákvörðunarinnar með smásjánni.

Nota má rafrænum agnateljara til ákvörðunar á heildarfrumurúmmáli Anabaena eftir að búið er að sundra frumukeðjunum varlega með hátiðnihljóðsundrun. Stilla þarf hátiðniorkuna þannig að frumurnar rofni ekki.

Nota skal iðublandara, eða sambærilega, viðeigandi aðferð, til að öruggt sé að þörungasviflausnin sem notuð er til sáningar í prófunarilátin sé vel blönduð og einsleit.

Prófunarilátin skulu sett á hristiborð sem snýr þeim í hringi eða hristir þau fram og tilbaka, um 150 snúninga á mínútu. Einnig má nota hristing með hléum til að draga úr kekkjamyndun Anabaena. Ef kekkir myndast þarf að aðgæta að það náist dæmigerð sýni fyrir mælingar á lífmassa. Nauðsynlegt getur verið að hrista kerfið kröftuglega til að sundra þörungakekkjum.

Synechococcus leopoliensis

Nota má margskonar æti til að viðhalda stofnrækt. Upplýsingar um hentugt æti eru fáanlegar hjá stofnasöfnum.

Synechococcus leopoliensis myndar stakar, staflaga frumur. Frumurnar eru mjög smáar og það gerir talningu í smásjá til mælingar á lífmassa flóknari. Gagnlegt er að nota rafrænan agnateljara sem getur talið agnir niður í u.þ.b 1 µm að stærð. Einnig er hægt að beita mælingum með flúrljómun í glasi.

Navicula pelliculosa

Nota má margskonar æti til að viðhalda stofnrækt. Upplýsingar um hentugt æti eru fáanlegar hjá stofnasöfnum. Taka þarf mið af því að nauðsynlegt er að hafa sílikat í ætinu.

Við ákveðin vaxtarskilyrði getur *Navicula pelliculosa* myndað þyrpingar. Vegna myndunar á lípíðum hafa þörungafrumurnar stundum tilhneigingu til að safnast fyrir í yfirborðslaginu. Við þær aðstæður þarf að gera sérstakar ráðstafanir til að ná dæmigerðum sýnum við töku undirsýna til ákvörðunar á lífmassa. Kröftugur hristingur, t.d. í iðublandara, getur verið nauðsynlegur.

3. viðbætur

Vaxtaræti

Nota má annað af eftirfylgjandi vaxtarætum:

- OECD-æti: Upphaflegt æti samkvæmt OECD TG 201, einnig samkvæmt ISO 8692.
- AAP-æti Umhverfisstofnunar Bandaríkjanna (US. EPA), einnig í samræmi við ASTM.

Við undirbúning þessa ætis skal nota íðefni af prófefnis- eða greiningarhreinleika, auk afjönaðs vatns.

Samsetning AAP-ætisins (US. EPA) og OECD TG 201-ætisins

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

Móhlutfall EDTA á móti járn er rétt yfir 1. Þetta kemur í veg fyrir útfellingu járn og um leið er klóbinding þungmálmsjóna lágörkuð.

Í prófun þar sem kísilþörungurinn *Navicula pelliculosa* er notaður þarf að bæta $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ í bæði ætin til að fá styrkinn 1,4 mg Si/l.

pH ætisins næst við jafnvægi milli karbónatkerfis ætisins og hlutþrýstings CO_2 í andrúmsloftinu. Sambandið milli pH við 25 °C og mólstyrks bikarbónatsins er u.þ.b.:

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

Með 15 mg NaHCO_3/l , $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (U.S. EPA-æti) og með 50 mg NaHCO_3/l , $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (OECD-æti).

Samsetning frumefna í prófunarætinu

Frumefni	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

OECD-æti búið til

Næringarefni	Styrkur í stofnlausn
Stofnlausn nr. 1:	
aðalnæringarefni	
	1,5 g/l
NH_4Cl	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Stofnlausn nr. 2:	
járn	
	64 mg/l
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l

Næringarefni	Styrkur í stofnlausn
Stofnlausn nr. 3:	
snefilefni	
	185 mg/l
H ₃ BO ₃	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/l
ZnCl ₂	3 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg/l
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/l
Stofnlausn nr. 4:	
bíkarbónat	
	50 g/l
NaHCO ₃	
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	

Stofnlausnir eru dauðhreinsaðar með himnusíun (meðalopstærð 0,2 µm) eða gufusæfðar (120 °C, 15 mín). Lausnir eru geymdar á dimmum stað við 4 °C.

Ekki skal setja stofnlausnir nr. 2 og nr. 4 í gufusæfi heldur dauðhreinsa þær með himnusíun.

Vaxtaræti er búið til með að bæta hæfilegu magni stofnlausna nr. 1–4 við vatn:

Við 500 ml af dauðhreinsuðu vatni er bætt:

10 ml af stofnlausn nr. 1

1 ml af stofnlausn nr. 2

1 ml af stofnlausn nr. 3

1 ml af stofnlausn nr. 4

Fyllt er upp að 1000 ml með dauðhreinsuðu vatni.

Ætinu er gefinn nægilegur tími til að ná jafnvægi við CO₂ úr andrúmsloftinu, ef nauðsyn krefur með loftbólun í nokkrar klukkustundir með lofti sem er dauðhreinsað með síun.

U.S. EPA-æti búið til

- Bætt er 1 ml úr hverri stofnlausn í 2.1–2.7 út í u.þ.b. 900 ml af afjónuðu eða eimuðu vatni og síðan þynnt upp að 1 l.
- Stofnlausnir með aðalnæringarefnum eru gerðar með því að leysa upp eftirfarandi í 500 ml af afjónuðu eða eimuðu vatni. Setja má prófefnin A2.1, 2.2, 2.3 og 2.4 saman í eina stofnlausn.

2.1 NaNO₃ 12,750 g.

2.2 MgCl₂·6H₂O 6,082 g.

2.3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,205 g.
2.4	Stofnlausn með snefilefnum (sjá 3).	
2.5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,350 g.
2.6	K ₂ HPO ₄	0,522 g.
2.7	NaHCO ₃	7,500 g.
2.8	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	Sjá 1. athugasemd

1. *athugasemd*: Notist aðeins fyrir prófunartegundir kísilþörungna. Má bæta beint í (202,4 mg) eða sem stofnlausn til að fá 20 mg/l lokastyrk Si í ætinu.

3. Stofnlausn með snefilefnum er gerð með því að leysa upp eftirfarandi í 500 ml af afjónuðu eða eimuðu vatni.

3.1	H ₃ BO ₃	92,760 mg.
3.2	MnCl ₂ ·4H ₂ O	207,690 mg.
3.3	ZnCl ₂	1,635 mg.
3.4	FeCl ₃ ·6H ₂ O	79,880 mg.
3.5	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714 mg.
3.6	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3,630 mg.
3.7	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,006 mg.
3.8	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	150,000 mg. (dínatríum-(etýlendínitril)tetraasetat).
3.9	Na ₂ SeO ₄ ·5H ₂ O	0,005 mg Sjá 2. athugasemd

2. *athugasemd*: Notist aðeins í æti fyrir stofnræktir kísilþörungategunda.

4. pH er stillt að $7,5 \pm 0,1$ með 0,1 N eða 1,0 N NaOH eða HCl.
5. Ætið er síað yfir í dauðhreinsað ílát, annað hvort með 0,22 µm himnusíu, ef nota á agnateljara, eða 0,45 µm síu ef ekki á að nota agnateljara.
6. Ætið er geymt á dimmum stað við u.þ.b. 4 °C þar til það er notað.

4. viðbætur

Dæmi um tilhögun við ræktun þörunga

Almennar athugasemdir

Tilgangurinn með ræktun á grundvelli eftirfarandi tilhögunar er að fá þörungaræktir fyrir eiturrhifaprófanir.

Nota skal heppilegar aðferðir til að tryggja að þörungaræktirnar sýkist ekki af bakteríum. Hreinræktir eru æskilegar en nauðsynlegt að koma á fót og nota einþörungsræktir.

Allar aðgerðir skulu fara fram við dauðhreinsaðar aðstæður til að koma í veg fyrir mengun af völdum baktería eða annarra þörunga.

Búnaður og efni

Sjá undir prófunaraðferð: Búnaður

Tilhögun við að fá fram þörungaræktir

Tilreiðsla næringarlausna (æti):

Öll næringarsölt í ætið eru búin til sem óblandaðar stofnlausnir og geymd í myrkri og kulda. Lausnirnar eru dauðhreinsaðar með síun eða í gufusæfi.

Ætið er búið til með því að bæta réttu magni af stofnlausn í dauðhreinsað, eimað vatn og þess gætt að engin smitun verði. Til að fá æti í föstu formi er bætt við 0,8% af agar.

Stofnrækt

Stofnræktirnar eru litlar þörungaræktir sem eru færðar reglubundið yfir í nýtt æti og nýttar sem upphafsprófunarefni. Ef ræktirnar eru ekki notaðar reglubundið er þeim strokið á agaræti í hallandi tilraunaglössum. Ræktirnar eru þá fluttar í nýtt æti eigi sjaldnar en annan hvern mánuð.

Stofnræktirnar eru ræktaðar í keilulöskum með viðeigandi æti (magn um það bil 100 ml). Ef þörungarnir eru ræktaðir við 20 °C í stöðugri lýsingu er nauðsynlegt að flytja þá í nýtt æti vikulega.

Við flutning í nýtt æti er ákveðið magn af „gömlu“ ræktinni flutt í flösku með nýju æti með dauðhreinsuðum pípettum þannig að upphafleg þéttni tegunda sem vaxa hratt er um það bil 1/100 af því sem er í gömlu ræktinni.

Vaxtarhraða tegundar má ákvarða út frá vaxtarferlinum. Ef hann er þekktur er hægt að áætla hversu þétt ræktin má verða áður en hún er flutt í nýtt æti. Þetta verður að gera áður en ræktin nær dauðafasa.

Forrækt:

Forræktin hefur þann tilgang að fá fram hæfilegt magn þörunga til sáningar í prófunarræktir. Forræktin er ræktuð við aðstæður prófunarinnar og notuð meðan hún er enn í veldisvexti, yfirleitt eftir 2 til 4 daga ræktunartíma. Ef þörungaræktir innihalda vanskapaðar eða afbrigðilegar frumur verður að fleygja þeim.

5. viðbætur

Ólínuleg aðhvarfsgreining á gögnum

Almenn umfjöllunaratriði

Svörun í þörungaprófunum og öðrum prófunum á vexti örvera, vöxtur lífmassa, er frá náttúrunnar hendi samfelld breyta eða raunbreyta — ferlishraði ef vaxtarhraðinn er notaður en heildi hans yfir tíma ef lífmassi er valinn. Báðar breyturnar hafa tilvísun í samsvarandi meðalsvörun samhliða samanburðarprófana, sem ekki komust í snertingu við váhrif, og sýna hámarkssvörun miðað við aðstæður en meginþættir við ákvörðun í þörungaprófuninni eru ljós og hiti. Kerfið er jafnað eða einsleitt og líta má á lífmassann sem samfellu án þess að tillit sé tekið til einstakra frumna. Dreifing dreifinnar í þeirri gerð svörunar sem fram kemur í kerfi af þessu tagi er einungis háð prófunarþáttum (dæmigerð lýsing á þeim er log-normaldreifing eða normaldreifing skekkja). Það er í andstöðu við dæmigerðar svaranir í lífgreiningu með skammtabundnum gögnum en í þeim eru víkmörk (sem hafa oftast tvíhliða dreifingu) hverrar lífveru talin sterkasti dreifniþátturinn. Svaranir samanburðarprófana eru í þessu tilviki núll eða bakgrunnsgildi.

Við einfaldari aðstæðurnar minnkar stöðluð eða hlutfallsleg svörun, r , einhalla frá 1 (engin vaxtarhindrun) að 0 (alger vaxtarhindrun). Taka þarf mið af því að allar svaranir hafa tengda skekkju og að það sem virðist vera neikvæð vaxtarhindrun er hægt að reikna út sem afleiðingu slembiskekkju.

Aðhvarfsgreining

Fyrirmyndir

Með aðhvarfsgreiningu er reynt að lýsa meginlega ferli styrkháðrar svörunar með stærðfræðilega aðhvarfsfallinu $Y = f(C)$, eða oftar með $F(Z)$, þar sem $Z = \log C$. Ef fallið er notað andhverft, $C = f^{-1}(Y)$, er hægt að reikna út EC_x -gildi, að EC_{50} , EC_{10} og EC_{20} meðtöldum, og 95% öryggismörk þeirra. Nokkur einföld, stærðfræðileg föll hafa reynst nothæf við að lýsa ferli styrks á móti svörun sem fram hefur komið við vaxtarhindrunarprófun á þörungum. Meðal þessara falla eru t.d. umhverfður veldisvísiferill, ósamhverf Weibull-jafna og fallið fyrir log-normaldreifingu, sem eru allt sigmoid-ferlar með aðföllunálgun á einum fyrir $C \rightarrow 0$, og á núlli fyrir $C \rightarrow \infty$.

Nýlegur kostur í stað aðföllulíkana er samfelld viðmiðunarlíkön (t.d. Kooijman -líkanið fyrir hindrun á stofnvexti, Kooijman et al. 1996). Í því líkani er ekki gert ráð fyrir áhrifum af styrk sem er undir ákveðnum viðmiðunarmörkum, EC_0+ , sem er metinn með framreikningi á ferli svörunar á móti styrk í skurðpunkti á styrkásnum, með einföldu, samfældu falli sem er ekki sundurgreinanlegt á upphafspunkti.

Taka þarf mið af því að greiningin getur verið einföld lágmarkun á summum kvaðratsleifa (með gefinni, samfældri dreifni) eða veginna kvaðrata, ef misleitni dreifni er jöfnuð.

Aðferð

Tilhöguninni má lýsa á eftirfarandi hátt: Valin er viðeigandi falljafna, $Y = f(C)$, og hún löguð að gögnunum með ólínulegu aðhvarfi. Æskilegt er að nota mælingar úr hverri flösku, frekar en meðalgildi samhliða prófananna, til að fá eins miklar upplýsingar úr gögnunum og unnt er. Ef dreifnin er mikil sýnir reynslan þó að meðalgildi úr samhliða prófunum geti veitt traustara stærðfræðilegt mat, sem kerfisbundin frávik í gögnunum hafa minni áhrif á, en hver gagnapunktur fyrir sig.

Aðlagaður ferill og mæligögn eru teiknuð upp og rannsakað hvort ferilaðlögunin er ásættanleg. Greining á aðhvarfsfrávikum getur verið sérlega gagnleg í þessum tilgangi. Ef fallið sem valið var fyrir feril styrks á móti svörun lýsir ekki vel ferlinum öllum, eða einhverjum nauðsynlegum hluta hans, s.s. svörun við lágan styrk, er valinn annar ferilaðlögunarmöguleiki – t.d. ósamhverfur ferill eins og Weibull-jafnan, í stað þess samhverfa. Neikvæð vaxtarhindrun getur valdið vandræðum, t.d. þegar notað er fall fyrir log-normaldreifingu, en það krefst einnig annars konar aðhvarfsfalls. Ekki er mælt með að gefa slíkum neikvæðum gildum núllgildi, eða lágt, jákvætt gildi, þar sem

Það raskar skekkjudreifingunni. Það getur átt við að gera mismunandi ferilaðlaganir á hlutum ferilsins, s.s. fyrir litla vaxtarhindrun, til að meta $EC_{\text{lágt } x}$ -gildi. Reiknað er út einkennandi punktmat EC_x -gilda með aðlöguðu jöfnunni (með „andhverfu mati“, $C = f^{-1}(Y)$) og tilgreind að lágmarki EC_{50} -gildi og eitt mat eða tvö á $EC_{\text{lágt } x}$ -gildum. Reynsla af prófunum hefur sýnt að nákvæmni í þörungaprófunum gefur nokkuð nákvæmt mat á 10% vaxtarhindrun ef gagnapunktur eru nægilega margir – nema ef örvun við lágan styrk reynist truflandi þáttur. Nákvæmni matsins á EC_{20} -gildum er oft verulega meiri en á EC_{10} -gildum vegna þess að EC_{20} -gildin eru oftast staðsett u.þ.b. á línulegu miðsvæði á ferli styrkháðrar svörunar. Stundum er erfitt að túlka EC_{10} -gildi vegna vaxtarörvunar. Þótt almennt sé hægt að fá nægilega nákvæm EC_{10} -gildi er því einnig mælt með að tilgreina alltaf EC_{20} -gildin.

Vægisstuðull

Dreifni í tilraunum er almennt ekki stöðug og felur yfirleitt í sér hlutfallsbundinn þátt og því er til bóta að gera reglulega aðhvarfsgreiningu. Vægisstuðlar fyrir þannig greiningu eru yfirleitt taldir vera í andhverfu hlutfalli við dreifnina:

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

Mörg aðhvarfsforrit gefa færi á veginni aðhvarfsgreiningu með vægisstuðlum sem eru gefnir upp í töflu. Handhægt er að staðla vægisstuðla með því að margfalda þá með $n/\Sigma w_i$ (n er fjöldi gagnapunkta) svo að summa þeirra jafngildi einum.

Stöðlun svörunar

Stöðlun með meðaltali samhliða samanburðarprófana hefur í för með sér grundvallarvandamál og veldur frekar flókinni dreifniskipan. Ef deilt er í svörunina með meðaltali svörunar úr samhliða samanburðarprófunum, til að fá vaxtarhindrun í hundradshlutum, veldur skekkjan í meðaltali samanburðarprófana viðbótarskekkju. Ef sú skekkja er ekki hverfandi lítil þarf að leiðrétta vægisstuðla í aðhvarfinu og öryggismörk fyrir samdreifni með samanburðarprófuninni (Draper and Smith, 1981). Taka þarf mið af því að mikil nákvæmni í metnu meðalgildi svörunar í samanburðarprófunum er mikilvæg til að hægt sé að lágmarka heildardreifnina fyrir hlutfallslegu svörunina. Þessi dreifni er reiknuð á eftirfarandi hátt:

(Hnévisirinn i vísar til styrkleika i og hnévisir 0 til samanburðarprófana)

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

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

og síðan $(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0$ og $(\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$

með normaldreifðum gögnum og samhliða prófunum m_i og m_0 : $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

verður heildardreifni hlutfallslegrar svörunar Y_i

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

Skekkja meðaltals samanburðarprófana er í andhverfu hlutfalli við kvaðratrótina af þeim fjölda samhliða samanburðarprófana, sem meðaltalið er reiknað af, og stundum er réttlæt看legt að taka með rannsóknarsöguleg gögn og draga þannig mikið úr skekkjunni. Annar möguleiki er að staðla ekki gögnin og aðlaga algildu svörunargildin, þ.m.t. gögn um svörun í samanburðarprófunum, en taka með svörunargildi úr samanburðarprófunum sem viðbótarmælipátt sem eru aðlöguð með ólínulegu aðhvarfi. Ef notuð er venjuleg tveggja mælipátta aðhvarfsjafna þarf að laga hana að þremur mælipáttum og því er þörf á fleiri gagnapunktum en við ólínulega aðhvarfsgreiningu á gögnum sem eru stöðluð með forstilltum svörunum úr samanburðarprófunum.

Andhverf öryggisbil

Útreikningar á öryggisbilum í ólínulegri aðhvarfsgreiningu með andhverfu mati er fremur flókið ferli og ekki staðalbúnaður í venjulegum tölfræðiforritapökkum. Hægt er að fara nærri öryggismörkum með venjulegum ólínulegum aðhvarfsforritum með mæliþáttabreytingu (Bruce and Versteeg, 1992) sem felur í sér endurritun stærðfræðijöfnunnar með völdu punktmati, t.d. nota EC_{10} og EC_{50} sem mæliþættina sem meta á. (Fallið er látið vera $I = f(\alpha, \beta, \text{styrkur})$ og notaðir skilgreiningarferlarnir $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ og $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ í stað $f(\alpha, \beta, \text{styrkur})$ með jafngilda fallinu $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{styrkur})$).

Beinni útreikningar (Andersen et al, 1998) eru gerðir með því að nota upprunalegu jöfnuna og Taylor-liðun í kringum meðaltal r_1 og r_0 .

Nálgun með handahófsúrtaki hefur nýlega náð vinsældum. Með þeim aðferðum er metin dreifing á dreifni, sem er byggð á athugunum, með því að nota gögn úr mælingum ásamt tíðum, endurteknum úrtökum stýrðum af slembitölugjafa.

HEIMILDIR

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) Í stað kafla C.11 komi eftirfarandi:

„C.11 PRÓFUN Á ÖNDUNARHÖMLUN Í VIRKRI SEYRU (OXUN KOLEFNIS OG AMMÓNÍUMS)

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 209 um prófanir (2010). Í þessari prófunaraðferð er lýst aðferð til að ákvarða áhrif íðefnis á örverur í virkri seyru (aðallega bakteríur) með því að mæla öndun þeirra (oxun kolefnis og/eða ammóníums) við skilgreindar aðstæður með mismunandi styrkleikum af prófunarefninu. Prófunaraðferðin grundvallast á prófun ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry) (1.–2. heimild), á fyrri OECD-viðmiðunarreglu 209 um prófanir (3. heimild) og á endurskoðuðum ISO-staðli 8192 (4. heimild). Tilgangurinn með þessari aðferð er að veita fljótvirka skimun til að meta áhrif íðefna á örverur í virku seyrunni á líffræðilega (loftháða) stiginu í skólphreinsistöðvum. Niðurstöður úr prófuninni geta einnig gefið vísbendingu um styrkleika prófunarefna sem eru ekki hamlandi og henta til notkunar í prófunum á lífbrjótanleika (t.d. kaflar C.4 A-F, C.9, C.10, C.12 og C.29 í þessum viðauka, OECD-viðmiðunarregla 302C). Í því tilviki má framkvæma prófunina sem skimunarprófun, svipað og skammtastærðar- eða markprófun (sjá 39. lið), með tilliti til heildaröndunar eingöngu. Þó ber að taka þessar upplýsingar með fyrirvara ef um er að ræða prófanir á auðlífbrjótanleika (kaflar C.4 A-F og C.29 í þessum viðauka) en í þeim er styrkur sáðs talsvert lægri en sá sem notaður er í þessari prófunaraðferð. Þótt engin hömlun greinist í þessari öndunarprófun hefur það raunar ekki sjálfkrafa í för með sér þá niðurstöðu að skilyrði við prófunina á auðlífbrjótanleika, samkvæmt köflum C.4 A-F eða C.29 í þessum viðauka, séu ekki hamlandi.

2. Á heildina litið virðist prófun á öndunarhömlun hafa verið beitt með góðum árangri síðan hún var fyrst birt en í sumum tilvikum hefur þó verið tilkynnt um falskar niðurstöður, t.d. (2. og 4.–5. heimild). Ferlar fyrir öndun eftir styrk eru stundum tvífasa, línurit fyrir skammtasvörun eru bjöguð og EC₅₀-gildi hafa verið lægri en búist var við (5. heimild). Rannsóknir sýndu að slíkar niðurstöður fáið þegar umtalsverð nítun á sér stað í virku seyrninni sem notuð er í prófuninni og prófunariðefnið hefur meiri áhrif á oxun ammóníums en á almenna oxun ófrumbjarga lífvera. Þar af leiðandi má komast hjá þessum fölsku niðurstöðum með því að framkvæma viðbótarprófanir þar sem notaður er sérstakur nítunarhamli. Með því að mæla súrefnisupptöku með og án slíks hamla, t.d. N-allýlþíóþvagefnis (ATU), er hægt að gera aðskilda útreikninga á súrefnisupptökunni, í heild sinni, hjá ófrumbjarga og nítandi lífverum (4. og 7.–8. heimild). Þannig er hægt að ákvarða hamlandi áhrif prófunariðefnis á þessa tvo ferla og reikna út EC₅₀-gildi fyrir oxun lífræns kolefnis (ófrumbjarga) og oxun ammóníums (nítun) á venjulegan hátt. Hafa ber í huga að í sumum sjaldgæfum tilvikum missir N-allýlþíóþvagefni hömlunaráhrif sín að hluta til eða algerlega af því það myndar efnaflóka með prófunariðefninu eða efnum sem er bætt við miðilinn, t.d. Cu⁺⁺ jónum (6. heimild). Cu⁺⁺ jónir eru nauðsynlegar fyrir *Nitrosomonas* en eru eittraðar í hærri styrk.
3. Þörfin fyrir nítun í loftháðri meðhöndlun skólps, sem nauðsynlegt skref í fjarlægingu köfnunarefnissambanda úr skólpi með því að afnitra þau í loftkenndar afurðir, er orðin brýn, einkum í evrópskum löndum, og Evrópusambandið hefur nú sett lægri mörk fyrir styrk köfnunarefnis í meðhöndluðu frárennsli sem er losað í viðtökuvatn ^(⁵).
4. Aðferðin til að meta áhrif á oxunarferli lífræns kolefnis er, ein og sér, fullnægjandi í flestum tilvikum. Í sumum tilvikum er þó nauðsynlegt að rannsaka áhrif á nítun eingöngu, eða á bæði nítun og oxun lífræns kolefnis hvors um sig, vegna túlkunar niðurstaðnanna og skilnings á áhrifunum.

MEGINREGLA PRÓFUNARADFERÐARINNAR

5. Öndun í sýnum virkrar seyrju í tilbúnu skólpi er mæld eftir þriggja klukkustunda snertitíma í umluktu hólfi sem í er rafskaut. Með tilliti til aðstæðna við raunveruleg váhrif gæti verið viðeigandi að snertitími sé lengri. Ef prófunariðefnið brotnar hratt niður, t.d. án tilstillis lífvera með vatnsrofi, eða er rokgjart og ekki er unnt að viðhalda styrk þess, má einnig nota styttra váhrifatímabil, t.d. 30 mínútur. Næmi hverrar lotu virkrar seyrju ber að athuga með viðeigandi viðmiðunariðefni á váhrifadegi. Prófunin er yfirleitt notuð til að ákvarða EC_x (t.d. EC₅₀) prófunariðefnisins og/eða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif.
6. Hömlun á súrefnisupptöku örvera sem oxa lífrænt kolefni má gefa upp aðskilið frá hömlun súrefnisupptöku örvera sem oxa ammóníum með því að mæla súrefnisupptöku með eða án N-allýlþíóþvagefnis, sértæks hamla á oxun nítunarbaktería, á fyrsta stiginu, á ammóníum í nítit. Í því tilviki er hlutfallsleg hömlun á súrefnisupptöku reiknuð með því að bera saman súrefnisupptöku með prófunariðefni og meðalsúrefnisupptöku í samsvarandi samanburðarprófunum sem eru án prófunariðefnis, bæði með og án sértæka hamlans N-allýlþíóþvagefnis.
7. Alla súrefnisupptöku sem á sér stað í ferlum án tilstillis lífvera má greina með því að ákvarða upptöku í blöndum með prófunariðefni, tilbúnu skólpi og vatni en engri virkri seyrju.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

8. Auðkenning (helst CAS-númer), heiti (IUPAC-heiti), hreinleiki, vatnsleysni, gufuþrýstingur, rokgirni og ásofseiginleikar prófunariðefnisins þurfa að vera þekkt til að unnt sé að túlka niðurstöðurnar á réttan hátt. Venjulega er ekki hægt að prófa rokgjörn íðefni á fullnægjandi hátt nema sérstakar varúðarráðstafanir hafi verið gerðar (sjá 21. lið).

⁽⁵⁾ Tilskipun ráðsins 91/271/EBE frá 21. maí 1991 um hreinsun skólps frá þéttbýli (Stjtið. EB L 135, 30.5.1991, bls. 40).

NOTKUNARSVIÐ PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

9. Prófunaraðferðina má nota á vatnsleysanleg, torleysanleg og rokgjörn íðefni. Ekki er þó alltaf unnt að fá EC₅₀-gildi með íðefnum með takmarkaða leysni og gildar niðurstöður með rokgjörnum íðefnum fást eingöngu að því tilskildu að prófunariðefnið verði að stærstum hluta (u.þ.b. > 80%) eftir í hvarfblöndunni í lok váhrifatímabils eða -tímabils. Þegar óvissa ríkir varðandi stöðugleika prófunariðefnisins eða rokgirni þess skal leggja fram viðbótargögn til stuðnings greiningunni til að afmarka betur EC_x-styrkinn.

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

10. Viðmiðunariðefni skal prófa reglubundið til að tryggja að prófunaraðferðin og prófunarskilyrði séu áreiðanleg og til að athuga næmi hverrar lotu af virkri seyru sem notuð er sem örverusáð á váhrifadeginum. Mælt er með íðefninu 3,5-díklórfeól (3,5-DCP) sem viðmiðunariðefni með hamlandi áhrif, þar eð þekkt er að það hamli öndun og það er notað í mörgum tegundum prófana á hömlun/eiturhrifum (4. heimild). Einnig má nota fimmvatnað kúprísúlfat sem viðmiðunariðefni vegna hömlunar á heildaröndun (9. heimild). Nota má n-metýlanilín sem sérstakan viðmiðunarhamla nítun (4. heimild).

GILDISVIÐMIÐANIR OG SAMANBURÐARNÁKVÆMNI

11. Súrefnisupptaka samanburðarblanka (án prófunariðefnis eða viðmiðunariðefnis) skal ekki að vera minni en 20 mg súrefnis á gramm af virkri seyru (þurrigt svifagna) á klukkustund. Ef upptakan er minni skal endurtaka prófunina með þveginni virkri seyru eða með seyru frá annarri uppsprettu. Frávíksstuðull súrefnisupptöku í samhlíða samanburðarprófunum skal ekki að vera meiri en 30% í lok endanlegu prófunarinnar.
12. Í alþjóðlegum hringprófunum, sem skipulagðar voru af Alþjóðlegu staðlasamtökunum (4. heimild), þar sem notuð var virk seyra úr heimilisskólpi, reyndist EC₅₀ 3,5-DCP vera á sviðinu 2 mg/l til 25 mg/l fyrir heildaröndun, 5 mg/l til 40 mg/l fyrir ófrumbjarga öndun og 0,1 mg/l til 10 mg/l fyrir öndun vegna nítun. Ef EC₅₀ fyrir 3,5-DCP er ekki á því bili sem vænta mætti, skal endurtaka prófunina með virkri seyru frá annarri uppsprettu. EC₅₀ fyrir fimmvatnað kúprísúlfat skal vera á bilinu 53–155 mg/l fyrir heildaröndun (9. heimild).

LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Prófunarilát og búnaður

13. Nota skal venjulegan rannsóknarstofubúnað og eftirfarandi:
 - a) Prófunarilát — til dæmis 1000 ml bikarglös fyrir 500 ml af hvarfblöndu (sjá 5. skýringu við 1. mynd);
 - b) Hólf og aukabúnaður til að mæla styrk uppleysts súrefnis; hentugt súrefnisrafskaut, umlukið hólf sem tekur sýnið án kollrúms og skrásetjari (t.d. 7.–9. skýring við 1. mynd í 2. viðbæti); eða flaska sem í er mæld lífræn súrefnisþörf (BOD-flaska) með hentugri tengimúffu til að einangra rafskautið ofan í flöskuhálsinn (sjá 2. mynd í 3. viðbæti). Til að koma í veg fyrir að vökvi tapist þegar rafskautið er sett inn er mælt með því að setja fyrst trekt eða glerpípu í gegnum múffuna, eða að nota ílát með brún sem vikkar út til jaðrana. Í báðum tilvikum skal nota segulhræribúnað eða aðra hræriaðferð, s.s. nema með sjálfvirkri hræringu.
 - c) Segulhræribúnaður og hræriseglar, þaktir hvarftregu efni, til notkunar í mælihólfi og/eða í prófunarilátunum.
 - d) Loftunarbúnaður: ef þörf krefur skal sía þrýstiloft í gegnum hentuga síu til að fjarlægja ryk og olíu og í gegnum skollföskur, sem innihalda vatn, til að rakabæta loftið. Loftblanda skal innihald ílátanna með Pasteur-pípettum eða öðrum loftunarbúnaði sem ásogar ekki íðefni. Til að fullnægja súrefnisþörf fyrir seyruna og yfirstíga erfiðleika varðandi íðefni sem framleiða of mikla froðu, eru rokgjörn og tapast því, eða sem erfitt er að dreifa þegar þau eru loftblönduð með loftbólhrensun, má nota hringhrístara sem gengur á snúningshraða milli 150 og 250 snún./mín með flöskum sem hafa t.d. 2000 ml rúmtak. Prófunarkerfið samanstendur venjulega af nokkrum bikarglösum sem eru loftuð stöðugt og sem eru sett upp með millibili (t.d. á 10–15 mínútna fresti) og síðan greind í þeirri röð. Einnig má nota fullgiltan tækjabúnað sem gerir kleift að lofta blöndurnar og mæla súrefnisupptökuna í þeim öllum samtímis,

- e) Sýrustigsmælir.
- f) Skilvinda, venjuleg skilvinda á prófunarbekk fyrir seyru sem tekur 10 000 m/s².

Prófefni

14. Nota skal prófefni af greiningarhreinleika allan tímann.

Vatn

15. Nota skal eimað eða afjónað vatn, sem inniheldur minna en 1 mg/l af uppleystu, lífrænu kolefni, nema þegar klórlausnt kranavatn er tilgreint.

Tilbúið skólp

16. Tilreiða skal miðillinn svo hann innihaldi eftirfarandi efnisþætti í tilgreindu magni:

— peptón	16 g
— kjótkraftur (eða sambærilegur jurtaþjarni)	11 g
— þvagefni	3 g
— natríumklóríð (NaCl)	0,7 g
— kalsíumklóríðdihýdrat (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	0,4 g
— magnesíumsúlfatheptahýdrat (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0,2 g
— vatnsfrítt kalímónóhýdrógenfosfat (K ₂ HPO ₄)	2,8 g
— eimað eða afjónað vatn allt að 1 lítra	

17. Sýrustig þessarar lausnar skal vera 7,5 ± 0,5. Ef tilreiddi miðillinn er ekki notaður strax skal geyma hann í myrkri við 0 til 4 °C, ekki lengur en í eina viku, eða við skilyrði sem ekki valda neinum breytingum á samsetningu hans. Hafa ber í huga að þetta tilbúna skólp er hundraðfalt þykkni miðað við það sem lýst er í tækniskýrslu OECD „Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents“ (11. júní, 1976), að viðbættu dikalíumvetnisfosfati.
18. Einnig má dauðhreinsa hvern efnisþátt miðilsins fyrir sig fyrir geymslu eða bæta peptóninu og kjótkraftinum við stuttu áður en prófunin er framkvæmd. Fyrir notkun skal blanda miðlinum vandlega og stilla pH-stigið, ef nauðsynlegt er, í 7,5 ± 0,5.

Prófunariðefni

19. Stofnlausn fyrir tilbúin vatnsleysanleg prófunarefni skal aðeins tilreidd upp að hámarks vatnsleysni (útfellingar eru ekki ásættanlegar). Efni sem eru torleysanleg í vatni, blöndur með efnisþáttum með ólíka vatnsleysni og ásogandi efni skal vigta beint í prófunarilátin. Í þeim tilvikum getur notkun stofnlausna verið valkostur ef styrkur uppleysta prófunariðefnisins er magngreindur í prófunarilátunum (áður en virkri seyru er bætt við). Ef vatnslagðir þættir (WAF) eru tilreiddir er magngreining styrks uppleystu prófunariðefnanna í prófunarilátunum einnig mikilvæg. Forðast skal notkun lífrænna leysa og dreifiefna/ýruefna til að bæta leysni. Mögulegt er að nota úthljóðsbúnað á stofnlausnir og að hræra sviflausnir fyrirfram, t.d. yfir nótt, þegar fullnægjandi upplýsingar liggja fyrir varðandi stöðugleika prófunariðefnisins við slík skilyrði.
20. Prófunarefnið gæti haft skaðleg áhrif á sýrustig innan prófunarkerfisins. Ákvarða skal sýrustig blandna sem eru meðhöndlaðar með prófunariðefni með forprófun fyrir uppsetningu prófunar, til að ganga úr skugga um hvort sýrustilling verði nauðsynleg fyrir aðalprófunina, og aftur á degi aðalprófunarinnar. Hlutleysa skal lausnir/sviflausnir prófunariðefnisins í vatni áður en sáði er bætt í, ef nauðsyn krefur. Þar eð hlutleysing getur breytt efnafræðilegum eiginleikum íðefnisins er þó mögulegt að framkvæma frekari prófanir, með hliðsjón af tilgangi rannsóknarinnar, til að meta áhrif prófunariðefnisins á seyrana án sýrustigsstillingar.

21. Eiturhrif rokgjarna íðefna, einkum í prófunum þar sem loftbólur eru leiddar í gegnum kerfið, geta gefið breytileg áhrifagildi sem eru vegna taps á efninu meðan á váhrifatímabilinu stendur. Sýna skal varkárni varðandi slík efni og með því að framkvæma efnasértæka greiningu, sem tekur til samanburðarblandna sem innihalda efnið, og með breytingu á loftunarfyrirkomulaginu.

Viðmiðunariðefni

22. Ef 3,5-díklórfeól er notað sem viðmiðunariðefni skal tilreiða lausn með 1,00 g af 3,5-díklórfeólí í 1000 ml af vatni (15. heimild). Nota skal volgt vatn og/eda úthljóðsbúnað til að hraða uppleysingunni og fylla upp að rúmmálinu þegar lausnin hefur kólnað niður í stofuhita. Þó skal tryggja að bygging viðmiðunariðefnisins taki ekki breytingum. Athuga skal pH-gildi lausnarinnar og stilla það í 7–8 með NaOH eða H₂SO₄, ef þörf krefur.
23. Ef fimmvatnað kúprísúlfat er notað sem viðmiðunariðefni er notaður styrkurinn 58 ml/l, 100 mg/l og 180 mg/l (stuðull 1,8). Efnið er vigtað beint í prófunarilátin (29–50–90 mg fyrir heildarrúmmál sem nemur 500 ml). Síðan er það leyst upp með 234 ml af gufusæfðu kranavatni. Fimmvatnað kúprísúlfat er auðleysanlegt. Við upphaf prófunar er bætt við 16 ml af tilbúnu skólpi og 250 ml af virkri seyru.

Sérstakur nítrunarhamli

24. Tilreiða skal 2,32 g/l af stofnlausn N-allýlþíóþvagefnis (ATU). Viðbót 2,5 ml af þessari stofnlausn, í ræktunarbúnaði með endanlegt rúmmál sem nemur 500 ml, leiðir til lokastyrksins 11,6 mg ATU/l (10⁻⁴ mól/l) sem þekkt er að nægi (4. heimild) til að valda 100% nítrunarhömlun í nítrandi virkri seyru sem inniheldur 1,5 g/l svifagna.

Samanburður án lífvera

25. Við ákveðin sjaldgæf skilyrði getur prófunariðefni sem hefur sterka afoxandi eiginleika valdið mælanlegri súrefnisupptöku án tilstillis lífvera. Í slíkum tilvikum er samanburðarprófun án lífvera nauðsynleg til að greina á milli súrefnisupptöku án tilstillis lífvera í prófunariðefninu og öndunar örvera. Tilreiða má samanburð án lífvera með því að hafa sáðið ekki í prófunarbúnaðinum. Á sama hátt má hafa með samanburð án lífvera og án sáðs þegar greiningarmælingar eru framkvæmdar til stuðnings ákvörðun á þeim styrk sem náðst hefur á váhrifafasa prófunarinnar, t.d. þegar notaðar eru stofnlausnir íðefna sem eru torleysanleg í vatni og innihalda efnabætti með mismunandi vatnsleysni. Í sérstökum tilvikum getur verið nauðsynlegt að tilreiða samanburð án lífvera með dauðhreinsuðu sáði (t.d. með gufusæfingu eða íbætingu dauðhreinsandi eitrefna). Sum íðefni geta eingöngu myndað eða tekið upp súrefni ef yfirborðsflöturinn er nógu stór til efnahvarfs, jafnvel þótt þau þurfi venjulega mun hærra hitastig eða hærri þrýsting til þess. Gefa skal peroxíðum sérstakan gaum að því er þetta varðar. Dauðhreinsað sáð veitir stóran yfirborðsflöt.

Sáð

26. Fyrir almenna notkun skal taka virka seyru úr útgangssopi loftunarþróar eða nálægt útgangssopi þróar, í skilvirkri skólphreinsistöð sem tekur aðallega á móti heimilisskólpi. Með hliðsjón af tilgangi prófunar má einnig nota aðrar fullnægjandi tegundir eða uppsprettur virkrar seyru, t.d. má einnig nota seyru sem ræktuð er á rannsóknarstofu í hentugum styrk svifagna sem er 2 g/l til 4 g/l. Þó má búast við að seyra frá mismunandi hreinsunarstöðvum hafi mismunandi eiginleika og næmleika.
27. Nota má seyruna um leið og henni hefur verið safnað en fjarlægja skal grófar agnir með því að láta hana setjast í stuttan tíma, t.d. 5 til 15 mínútur, og umhella efsta lagi smárra efnisagna eða sigta hana (t.d. með 1 mm² möskvum). Að öðrum kosti má gera seyruna einsleita í blandara í u.þ.b. 15 sekúndur eða lengur en sýna þarf varkárni vegna álags og hitabreytinga sem gætu orðið þegar blandað er í langan tíma.

28. Oft er nauðsynlegt að þvo seyrur, t.d. þegar innræn öndun er lítil. Skilja skal seyrur fyrst í skilvindu í dálitinn tíma, t.d. í 10 mínútur við 10 000 m/s², til að fá tært flot og köggul úr skólþögnum. Flotinu skal fleygt og seyrur enduruppleyst í klórlausu kranavatni með hristingi og þvottavatnið svo fjarlægt með því að skilja það aftur frá í skilvindu og fleygja því. Endurtaka skal þvott og skiljun ef nauðsyn krefur. Ákvarða skal þekktan, þurrar massa af enduruppleystu seyrur og hún þykkt með því að fjarlægja vökva eða hún þynnt frekar í klórlausu kranavatni til ná nauðsynlegum styrk fastra efna í seyrur, 3 g/l. Loftblanda skal virku seyrur stöðugt (t.d. 2 l/mín.) við prófunarhitastig og nota hana, ef unnt er, sama dag og henni er safnað. Ef það er ekki hægt skal bæta daglega í hana tilbúnu skólpi (50 ml tilbúið skólpl af virkri seyrur) í tvo daga til viðbótar. Seyrur er svo notuð í prófunina og niðurstöðurnar eru samþykktar sem gildir að því tilskildu að engin marktæk breyting hafi orðið á virkni hennar sem er metin samkvæmt innrænni ófrumbjarga og nítrandi öndun í henni.
29. Það getur valdið vandkvæðum ef froða myndast meðan á ræktun stendur að því marki að froðan þrýstist út úr loftunarlátunum ásamt föstu efnunum úr seyrur sem sitja á henni. Öðru hverju orsakast froðumyndun einfaldlega af tilbúna skólpinu en búast skal við froðumyndun ef prófunariðefnið er, eða inniheldur, yfirborðsvirkt efni. Tap á föstum efnunum í seyrur úr prófunarblöndunum leiðir til falskrar minnkunar á önduninni sem getur verið ranglega túlkuð sem afleiðing hömlunar. Auk þess þykkir loftun lausnar með yfirborðsvirku efni yfirborðsvirka efnið í froðulaginu og tap á froðu úr prófunarkerfinu mun lækka váhrifastyrkinn. Hægt er að stjórna froðumyndun með einföldum aflrænum aðferðum (t.d. með því að hræra í öðru hverju með glerstaf) eða með því að bæta í froðueyði án yfirborðsvirks efnis í formi sílikonfleytis og/eða nota hristiflöskuaðferðina til loftunar. Ef vandamálið tengist því að tilbúið skólpl er notað skal breyta samsetningu skólpsins með því að bæta froðueyðandi prófefni við, t.d. í hlutföllunum 50 µl/l. Ef prófunariðefnið veldur froðumynduninni skal ákvarða það magn sem þarf til að draga úr henni við hámarks prófunarstyrkleikann og síðan skal meðhöndla hvert og eitt loftunarlát á sama hátt (þ.m.t. ílátin fyrir samanburðarblanka og viðmiðunarlátin, þar sem engin froða finnst). Ef froðueyðar eru notaðir skulu þeir ekki komast í snertingu við sáðið og/eða prófunariðefnið.

PRÓFUNARAÐFERÐ

30. Ákvarða má hömlun á þremur mismunandi leiðum súrefnisupptöku, heildarupptöku, upptöku ófrumbjarga lífvera eingöngu og vegna nítrunar. Venjulega ættu mælingar á hömlun á heildarupptöku súrefnis að vera fullnægjandi. Áhrif oxunar lífræns kolefnis og oxunar ammóníums á súrefnisupptöku ófrumbjarga lífvera þurfa að vera þekkt þegar sértæk krafa er gerð um tvo slíka endapunkta fyrir tiltekið íðefni eða (valkvætt) til að skýra ódæmigerðan skammtasvörunarferil vegna hömlunar á heildarupptöku súrefnis.

Prófunarskilyrði

31. Prófunin skal fara fram við hitastig á bilinu 20 ± 2 °C.

Prófunarblöndur

32. Tilreiða skal prófunarblöndur (F_T eins og í töflu 1) sem innihalda vatn, tilbúið skólpl og prófunariðefnið til að fá mismunandi nafnstyrk prófunariðefnisins (sjá töflu 1 fyrir dæmi um rúmmál innihaldsefna). Stilla skal pH-gildið í $7,5 \pm 0,5$, ef þörf krefur, þynna skal blöndur með vatni og sáðinu bætt við til að fá jöfn lokarúmmál í ílátum og loftun hafin.

Viðmiðunarböndur

33. Blöndur (F_R) skal tilreiða á sama hátt og prófunarblöndurnar með viðmiðunariðefninu, t.d. 3,5-díklórphenóli, í stað prófunariðefnisins.

Samanburðarblankar

34. Samanburðarblanka (F_B) skal tilreiða við upphaf og lok váhrifatímabils í prófunum þar sem prófunarglösín eru sett upp hvert á fætur öðru með millibili. Ef prófunin er framkvæmd með búnaði sem gerir margar mælingar á súrefnisupptöku samtímis skal bæta a.m.k. tveimur samanburðarblönkum í hverja lotu sem er greind samtímis öðrum. Samanburðarblankar innihalda sama rúmmál af virkri seyru og tilbúnum miðli en hvorki prófunar- né viðmiðunariðefni. Þeir skulu þynntir með vatni í sama rúmmál og prófunar- og viðmiðunarböndurnar.

Samanburður án lífvera

35. Ef þörf er á skal tilreiða blöndu F_A til að mæla súrefnisupptöku án tilstillis lífvera, t.d. ef prófunariðefni hefur, eða er grunað um að hafa, mikla afoxandi eiginleika. Í blöndunni skal vera sama magn prófunariðefnis og tilbúins skólps og hún skal hafa sama rúmmál og prófunarböndurnar en ekki innihalda virka seyru.

ALMENNT VERKFERLI OG MÆLINGAR

36. Prófunarböndur, viðmiðunarböndur og samanburðarblankar og samanburðir án lífvera eru látin standa við prófunarhitastigið og þrýstiloftun (e. *forced aeration*) (0,5 til 1 l/mín) til að halda styrk uppleysts súrefnis yfir 60–70% metnun og til að halda seyruhnati í stöðugri sviflausn. Einnig er nauðsynlegt að hræra í ræktunum til að halda seyruhnati í stöðugri sviflausn. Litið er svo á að ræktunin hefjist með upphafssnertingu sáðsins úr virku seyrunni við aðra efnisþætti lokablöndunnar. Í lok ræktunar, eftir tiltekinn váhrifatíma sem er venjulega 3 klukkustundir, eru tekin sýni til að mæla hvort dregið hefur úr styrk uppleysts súrefnis í hólfinu sem hannað er í þeim tilgangi (mynd 2 í 3. viðbæti) eða í BOD-flösku sem er alveg full. Afkastageta búnaðarins til mælingar á súrefnisupptöku ræður því líka á hvaða hátt ræktunin hefst. Ef súrefnisneminn í honum er stakur eru mælingarnar framkvæmdar hver fyrir sig. Í því tilviki skal tilreiða hinar ýmsu böndur sem þarf fyrir prófunina í tilbúnu skólpi en sáðið látið biða og tilskilda skammtinum af seyru svo bætt í hvert ílát prófunarraðarinnar. Hefja skal hverja ræktun á fætur annarri með t.d. 10 til 15 mínútna millibili, eftir hentugleika. Mælikerfi getur einnig samanstðið af mörgum nemum, sem auðveldar margar mælingar á sama tíma, og í því tilviki má bæta sáðinu í viðkomandi hópa íláta á sama tíma.
37. Nafnstyrkur virkrar seyru í öllum prófunarböndum, viðmiðunarböndum og samanburðarblankasýnum (en ekki í samanburði án lífvera) er venjulega 1,5 g/l af svifögnum. Mæla skal súrefnisupptöku eftir váhrif í 3 klukkustundir. Viðbótarmælingar skulu framkvæmdar eftir váhrif í 30 mínútur, eftir því sem við á og er áður lýst í 5. lið.

Möguleg nítrun seyru

38. Til að ákvarða hvort seyra níturst og, ef svo er, á hvaða hraða, skal tilreiða böndur (F_B) sem eru eins og samanburðarblankurinn og aðrar böndur til samanburðar (F_N) en sem þó innihalda einnig N-allýlþíóþvagefni við 11,6 mg/l. Böndurnar skulu loftblandaðar og hafðar við 20 °C ± 2 °C í 3 klukkustundir. Síðan skal mæla súrefnisupptöku og reikna súrefnisupptöku vegna nítrunar.

Tilhögun prófunar

Skammtastærðarrannsókn

39. Ef nauðsyn krefur er notuð forprófun til að áætla hvaða styrkleikasvið prófunariðefnisins þarf í endanlega prófun til að ákvarða hömlun á súrefnisupptöku. Ef hins vegar engin hömlun á súrefnisupptöku kemur fram með prófunariðefninu í forprófun getur það bent til þess að endanleg prófun sé ekki nauðsynleg en þá skal hafa með þrjár prófanir með hæsta prófaða styrk forprófunarinnar (yfirleitt 1000 mg/l en fer eftir þeim gögnum sem krafist er).

Tafla 1

Dæmi af blöndum fyrir forprófunina

Prófefni	Upphaflegur styrkur				
Stofnlausn prófunariðefnis	10 g/l				
Stofnlausn tilbúins miðils	Sjá 16. lið				
Stofnlausn virkrar seyru	3 g/l af svifögnum				
Efnisþættir í blöndum	Skömmtnun í prófunarílát 1				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
Stofnlausn prófunariðefnis (ml) (19. til 21. liður)	0,5	5	50	0	50
Stofnlausn tilbúins skólps (16. liður)	16	16	16	16	16
Sviflausn virkrar seyru (ml) (26. til 29. liður)	250	250	250	250	0
Vatn (15. liður)	233,5	229	184	234	434
Heildarrúmmál blandna (ml)	500	500	500	500	500
Styrkleikar í blöndunni:					
Prófunarsviflausn mg/l	10	100	1000	0	1000
Virk seyra (svifagnir) (mg/l)	1500	1500	1500	1500	0

(^a) Fylgja skal sömu aðferð með viðmiðunariðefninu til að tilreiða flöskur F_{R1-3}

40. Framkvæma skal prófunina með því að nota prófunariðefnið í a.m.k. þremur styrkleikum, t.d. 10 mg/l, 100 mg/l og 1000 mg/l með samanburðarblanki og, ef nauðsyn krefur, með a.m.k. þremur samanburðum án lífvera í hæsta styrk prófunariðefnisins (sjá dæmi í töflu 1). Æskilegt er að minnsti styrkurinn hafi ekki hafa nein áhrif á súrefnisupptöku. Reikna skal súrefnisupptöku og nítrun, ef það skiptir máli, og svo skal reikna hlutfall hömlunar. Með hliðsjón af tilgangi prófunarinnar er einnig hægt að ákvarða einfaldlega eiturhrif markstyrks, t.d. 1000 mg/l. Ef engin tölfærðilega marktæk eiturhrif greinast fyrir þennan styrk eru frekari prófanir við hærri eða lægri styrkleika ekki nauðsynlegar. Hafa ber í huga að efni sem eru torleysanleg í vatni, blöndur með efnisþáttum með ólíka vatnsleysni og ásogandi efni skulu vigtuð beint í prófunarílatin. Í því tilviki skal skipta út stofnlausn prófunariðefnisins með sama magni af þynningarvatni.

Endanleg prófun

Hömlun á heildarupptöku súrefnis

41. Framkvæma skal prófunina með því að nota það svið styrkleika sem var leitt út af forprófuninni. Í flestum tilvikum er mælt með sex samanburðum og fimm meðhöndlunarstyrkleikum í jafnhlutfallaröð með fimm samhlíða prófunum til að fá bæði styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif sem og EC_x (t.d. EC₅₀). Ekki þarf að endurtaka samanburð án lífvera ef engin súrefnisupptaka var í forprófuninni en ef marktæk upptaka á sér stað skal bæta við samanburði án lífvera fyrir hvern styrkleika prófunariðefnisins. Athuga skal næmi seyrunnar með því að nota viðmiðunariðefnið 3,5-díklórénól. Athuga skal næmi seyrunnar fyrir hverja prófunarröð þar eð vitað er að næmi sveiflast. Í öllum tilvikum eru sýni tekin úr prófunarílatunum eftir 3 klukkustundir, og einnig eftir 30 mínútur ef þörf krefur, til að mæla súrefnisupptöku í hólfinu með súrefnisrafskautinu. Sértek öndun í samanburðar- og prófunarblöndunum er reiknuð út frá gögnunum sem aflað hefur verið og hlutfallsleg hömlun er síðan reiknuð með 7. jöfnu hér á eftir.

Aðgreining á hömlun á ófrumbjarga öndun og nítrun

42. Notkun sérstaks nítrunarhamla, ATU, gerir kleift að meta beint hamlandi áhrif prófunariðefnanna á oxun ófrumbjarga lífvera og með því að draga hlutfall súrefnisupptöku þegar ATU er til staðar frá heildarupptöku (ekkt ATU til staðar) má reikna út áhrifin á hlutfall nítrunar. Tilreiða skal tvö sett af hvarfblöndum, samkvæmt tilhögun prófunar fyrir EC₅ eða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif sem lýst er í 41. lið, en auk þess skal bæta ATU í hverja blöndu í öðru settinu í lokastyrknum 11,6 mg/l, en sýnt hefur verið fram á að hann hamli nítrun alfarið í seyru með svifögnum í styrkleikum allt að 3000 mg/l (4. heimild). Mæla skal súrefnisupptöku eftir váhrifátímabilið; þessi beinu gildi sýna ófrumbjarga öndun eingöngu og mismunurinn á þeim og samsvarandi heildaröndun sýna nítrun. Mismunandi stig hömlunar eru síðan reiknuð út.

Mælingar

43. Eftir váhrifátímabilið, eða váhrifátímabilin, skal færa sýni úr fyrsta loftunarlátinu í hólfid með súrefnisrafskautinu (mynd 1 í 2. viðbæti) og styrkur uppleysts súrefnis skal mældur strax. Ef um er að ræða kerfi með mörgum rafskautum má framkvæma mælingarnar samtímis. Nauðsynlegt er að hrætt sé (með húðuðum segli) á sama hraða og notaður var við kvörðun rafskautsins til að tryggja að neminn svari breytingum í súrefnisstyrk sem hraðast og til að gefa færi á reglulegum og samanburðarnákvæmum súrefnismælingum í mælingarlátinu. Sum súrefnisrafskaut eru búin kerfi með sjálfvirkri hræringu nema sem oftast nægir. Skola skal hólfid með vatni á milli mælinga. Að öðrum kosti má nota sýnið til að fylla BOD-flösku (mynd 2 í 3. viðbæti) sem er búin segulhræribúnaði. Síðan skal súrefnisnemi með tengimúffu settur í flöskuhálsinn og kveikt á segulhræribúnaðinum. Í báðum tilvikum skal styrkur uppleysts súrefnis mældur samfelt og skráður yfir tímabil sem er yfirleitt 5 til 10 mínútur eða þangað til súrefnisstyrkurinn fellur undir 2 mg/l. Fjarlægja skal rafskautið, skila blöndunni aftur í loftunarlátið og halda áfram að lofta og hræra ef mæling eftir lengri váhrifátímabil er nauðsynleg.

Sannprófun á styrk prófunariðefnisins

44. Í sumum tilvikum getur verið nauðsynlegt að mæla styrk prófunariðefnisins í prófunarkerjunum. Hafa ber í huga að ef notaðar eru stofnlausnir úr:

— efnun sem eru torleysanleg í vatni,

— blöndum með efnisþáttum með ólíka vatnsleysni, eða

— efnun sem eru vel leysanleg í vatni en styrkur stofnlausnarinnar er nærri hámarksvatnsleysni,

að uppleysti þátturinn er óþekktur og að raunverulegur styrkur prófunariðefnisins sem fært er í prófunarkerin er óþekktur. Nauðsynlegt er að gera greiningarmat á styrk prófunariðefnisins í prófunarkerjunum til að lýsa váhrifunum. Til einföldunar skal framkvæma greiningarmatið áður en sáðinu er bætt við. Þar eð eingöngu uppleystu þættirnir eru færðir í prófunarkerin getur mældur styrkur verið mjög lágur.

45. Til að koma í veg fyrir tímafrekar og kostnaðarsamar greiningar er mælt með því að vigta prófunariðefnið einfaldlega beint í prófunarkerin og að visa til nafnstyrksins sem var veginn í upphafi í síðari útreikningum. Aðgreining milli uppleystra, óuppleystra eða ásoginna þátta prófunariðefnisins er ekki nauðsynleg þar eð allir þessir þættir birtast einnig við raunveruleg skilyrði í skólphreinsistöð og geta verið breytilegir eftir samsetningu skólpsins. Markmið prófunaraðferðarinnar er að gera raunhæfa áætlun á styrkleika sem er ekki hamlandi og hentar ekki til að rannsaka ítarlega hvaða þættir eiga þátt í hömlun örvera í virkri seyru. Loks skal vigta ásogandi efni beint í prófunarkerin og skulu kerin vera silanhúðuð til að halda tapi vegna ásogs í lágmarki.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Útreikningur á súrefnisupptöku

46. Reikna skal súrefnisupptöku út frá meðaltali mældu gildanna, t.d. frá línulegum hluta línuritanna fyrir styrk súrefnis á móti tíma, sem takmarkar útreikninga við súrefnisstyrk á milli 2,0 mg/l og 7,0 mg/l þar eð hærri og lægri styrkur getur sem slíkur haft áhrif á upptöku. Frávik sem ná til styrks sem er lægri eða hærri en þessi gildi eru stundum óhjákvæmileg og nauðsynleg, til að mynda þegar öndun er verulega hömluð og af þessum sökum mjög lítil eða þegar öndun tiltekinnar virkrar seyru er mjög ör. Það er ásætlanlegt að því tilskildu að framlengdir hlutar línuritsins sem sýnir upptöku séu beinir og stíglar þeirra breytist ekki þegar þeir fara í gegnum 2,0 mg/l- eða 7,0 mg/l O₂ mörkin. Allir sveigðir hlutar línuritsins gefa til kynna að mælikerfið sé að ná stöðugleika eða að upptaka sé að breytast og skulu ekki notaðir til útreiknings á öndun. Súrefnisupptaka skal gefin upp í milligrömmum á lítra á klukkustund (mg/lh) eða í milligrömmum á gramm af þurri seyru á klukkustund (mg/gh). Súrefnisupptöku, (R) gefin upp í mg/lh, má reikna eða innreikna út frá línulega hluta skráða línuritsins yfir súrefnisminnkunina, samkvæmt 1. jöfnu:

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

þar sem:

Q₁ er styrkur súrefnis við upphaf valins hluta línulega fasans (mg/l).

Q₂ er styrkur súrefnis í lok valins hluta línulega fasans (mg/l).

Δ_t er tímabilið á milli þessara tveggja mælinga (mín.).

47. Sértek öndun (R_s) er gefin upp sem magn súrefnis sem tekið er upp á hvert g þurrvigtar af seyru á klukkustund (mg/gh), samkvæmt 2. jöfnu:

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

þar sem SS er styrkur svifagna í prófunarblöndunni (g/l).

48. Þeir mismunandi vísar R sem nota má saman eru:

S sértæk öndun

T heildaröndun

N öndun vegna nítunar

H öndun ófrumbjarga lífvera

A öndun vegna ferla án tilstillis lífvera

B öndun byggð á blanksýnum (meðaltal)

Útreikningur súrefnisupptöku vegna nítunar

49. Sambandið milli heildaröndunar (R_T), öndunar vegna nítunar (R_N) og ófrumbjarga öndunar (R_H) fæst með 3. jöfnu:

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

þar sem:

R_N er súrefnisupptaka vegna nitrunar (mg/lh).

R_T er mæld súrefnisupptaka samanburðarblanks (án ATU; F_B) (mg/lh).

R_H er mæld súrefnisupptaka samanburðarblanks með viðbættu ATU (F_N) (mg/lh).

50. Samband þetta gildir fyrir blankgildi (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), samanburð án lífvera (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) og prófanir með prófunaríðefnum (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/gh). Sértek öndun er reiknuð út frá:

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

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

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

51. Ef R_N er óveruleg (t.d. < 5% af R_T í samanburðarblöndum) í forprófun má gera ráð fyrir að ófrumbjarga súrefnisupptaka og heildarupptaka séu jafnar og að engin nitrin eigi sér stað. Finna þyrfti aðra uppsprettu virkrar seyru ef markmið prófana væri að greina áhrif á ófrumbjarga og nitrandi örverur. Endanleg prófun er framkvæmd með mismunandi styrkleikum prófunaríðefnis ef vísbendingar eru um bælda súrefnisupptöku.

Útreikningur á hlutfalli hömlunar

52. Hlutfallsleg hömlun á heildarsúrefnisupptöku, I_T , fyrir hvern styrkleika prófunaríðefnisins fæst með 7. jöfnu:

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

53. Á sama hátt fæst hlutfallsleg hömlun á ófrumbjarga súrefnisupptöku, I_H , fyrir hvern styrkleika prófunaríðefnisins með 8. jöfnu:

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

54. Loks fæst hömlun á súrefnisupptöku vegna nitrunar, I_N , fyrir hvern styrkleika með 9. jöfnu:

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

55. Teikna skal hlutfallslega hömlun á súrefnisupptöku á móti logra styrks prófunaríðefnisins (hömlunarferill, sjá mynd 3 í 4. viðbæti). Hömlunarferlar eru teiknaðir fyrir hvert 3 klst. loftunartímabil eða aukalega eftir 30 mín. Styrkleiki prófunaríðefnisins sem hamlar súrefnisupptöku um 50% (EC_{50}) skal reiknaður eða innreiknaður út frá línuritinu. Ef viðeigandi gögn liggja fyrir má reikna eða innreikna 95% öryggismörk EC_{50} , hallatölu ferilsins, viðeigandi gildi til að sýna upphaf hömlunar (t.d. EC_{10} eða EC_{20}) og lok hömlunarstyrks (t.d. EC_{80} eða EC_{90}).

56. Með tilliti til breytileikans sem kemur fram í niðurstöðum ber að hafa í huga að í mörgum tilvikum gæti verið nægilegt að gefa upp niðurstöðurnar aukalega í stærðarþrepum, til dæmis:

EC_{50} < 1 mg/l

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

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

EC_{50} > 100mg/l

Túlkun niðurstaðna*EC_x*

57. EC_x-gildi fyrir breytur, þ.m.t. tilheyrandi neðri og efri 95% öryggismörk, eru reiknuð út með viðeigandi tölfræðiaðferðum (t.d. probit-greiningu, umhverfðri jöfnu eða Weibull-jöfnu, klipptri Spearman-Kärber-aðferð eða einföldum innreikningi (11. heimild)). EC_x fæst með því að setja gildi, sem samsvarar x% af meðaltali samanburðarins, inn í jöfnuna sem fæst. Til að reikna út EC₅₀ eða annað EC_x skulu meðaltalsgildi formeðhöndlunar (x) sett í aðhvarfsgreiningu.

Mat á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif

58. Ef tölfræðilegri greiningu er ætlað að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif er nauðsynlegt að nota tölfræðilegar upplýsingar um hvert ílát (lítið er á hvert stöku ílátanna sem samhliða prófun). Nota skal viðeigandi tölfræðiaðferðir samkvæmt skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um gildandi nálganir við tölfræðilega greiningu gagna um visteiturhrif: Leiðbeiningar fyrir notkun (e. *OECD Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*) (11. heimild). Skaðleg áhrif prófunariðfnisins samanborið við samanburðarprófunina eru yfirleitt rannsökuð með því að nota einhliða (minni) tilgátuprófun við $p \leq 0,05$.

Prófunarskýrsla

59. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunariðefni

- almennt heiti, efnaheiti, CAS-númer, hreinleiki,
- eðlisefnafræðilegir eiginleikar prófunariðfnisins (t.d. log K_{OW}, vatnsleysni, gufuþrýstingur, fasti samkvæmt Henry (H) og mögulegar upplýsingar um aðdrif prófunariðfnisins, t.d. ásgöng í virka seyrju),

Prófunarkerfi

- uppspretta, starfsskilyrði skólphreinsistöðvar og aðrennsli þess, styrkur, formeðhöndlun og viðhald virku seyrunnar,

Prófunarskilyrði

- prófunarhitastig, sýrustig á meðan á prófun stendur og lengd váhrifatímabils eða -tímabils,

Niðurstöður

- sértæk súrefnisupptaka samanburðarprófana (mg O₂/(g af seyrju × h),
- öll mæld gögn, hömlunarferill, eða -ferlar, og aðferð til að reikna út EC₅₀,
- EC₅₀ og, ef unnt er, 95% öryggismörk, mögulega EC₂₀, EC₈₀; mögulega styrkurinn sem hefur engin merkjanleg áhrif og tölfræðiaðferðir sem notaðar voru, ef ekki er unnt að ákvarða EC₅₀,
- niðurstöður fyrir heildarhömlun, og ef við á, hömlun hjá ófrumbjarga og nítrandi lífverum,
- súrefnisupptaka án tilstillis lífvera í eðlisefnafræðilegri samanburðarprófun (ef notuð),
- heiti viðmiðunariðfnis og niðurstöður með því íðefni,
- allar athuganir og hvers kyns frávik frá stöðluðu verklagsreglunni sem gætu hafa haft áhrif á niðurstöðuna.

HEIMILDIR

- 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-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.
 - 7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.
 - 8) Robra, B. (1976). *Wasser/Abwasser* 117, 80.
 - 9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.
 - 10) ISO (1995). ISO 10634 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.
-

*1. viðbætur***Skilgreiningar**

Eftirfarandi skilgreiningar gilda fyrir þessa prófunaraðferð.

Íðefni er efni eða blanda.

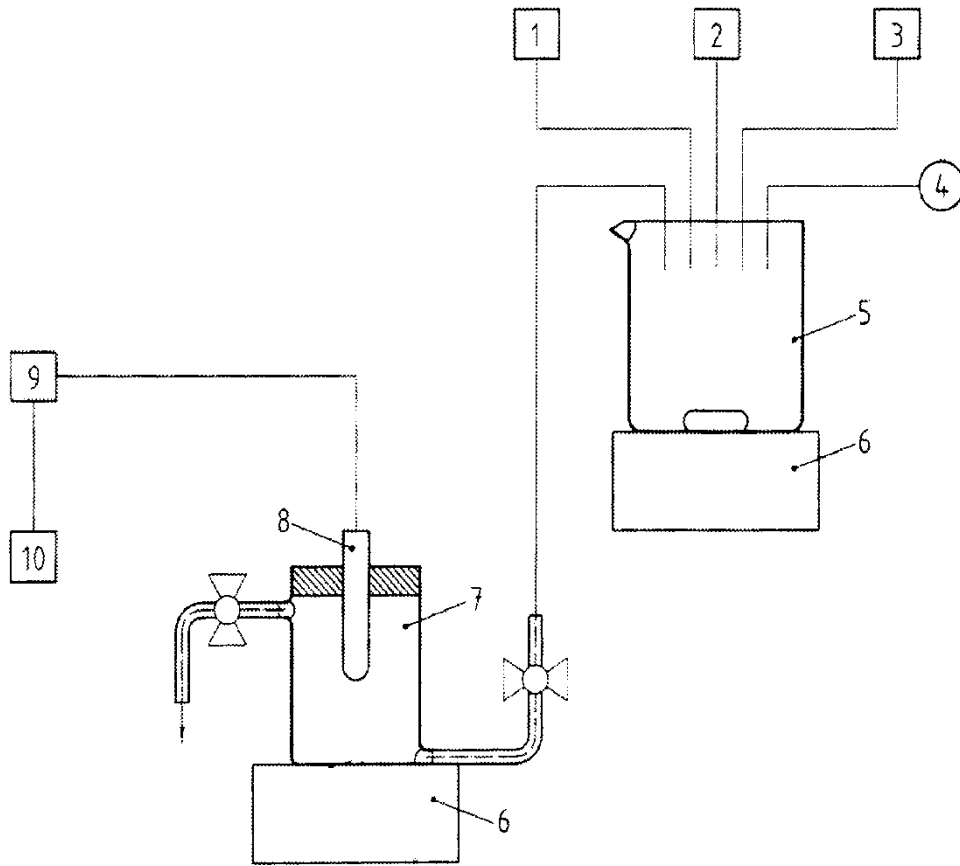
EC_x (styrkur sem hefur x% áhrif) er sá styrkur sem hefur x% áhrif á prófunarlífverur innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun. Til dæmis er EC₅₀ sá styrkur sem metið er að hafi, við prófunarendapunkt, áhrif á 50% af þýði sem er látið verða fyrir váhrifum yfir tilgreint váhrifatímabil.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) er sá styrkur prófunariðefnis sem hefur engin merkjanleg áhrif. Í þessari prófun hefur styrkur sem svarar til NOEC engin tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) á tilteknu váhrifatímabili, samanborið við samanburðarsýni.

Prófunariðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

2. viðbætur

Mynd 1: Dæmi um mælieiningu

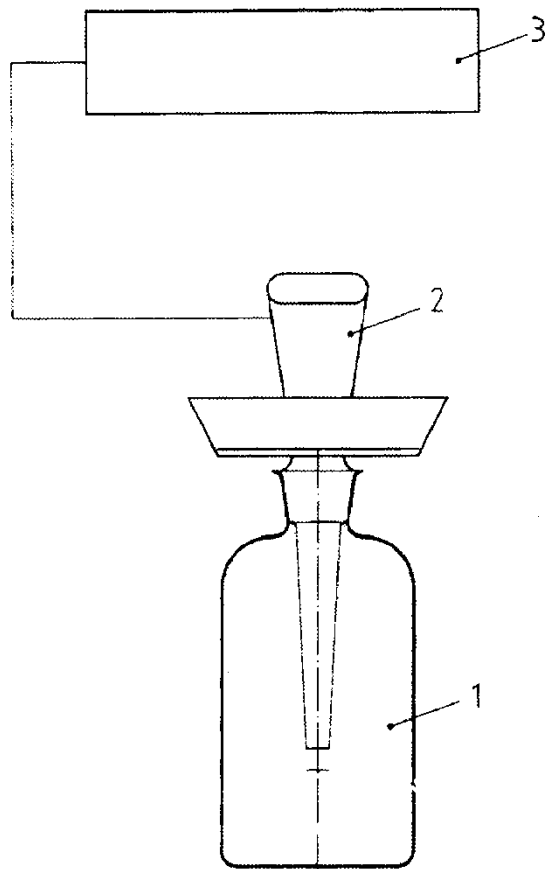


Skýringar:

- | | | | |
|---|-----------------|----|-------------------|
| 1 | virka seyra | 6 | segulhræribúnaður |
| 2 | tilbúinn miðill | 7 | súrefnismælihölf |
| 3 | prófunariðefni | 8 | súrefnisrafskaut |
| 4 | loft | 9 | súrefnismælitæki |
| 5 | blöndunarílát | 10 | riti |

3. viðbætur

Mynd 2: Dæmi um mælieiningu með notkun BOD-flösku

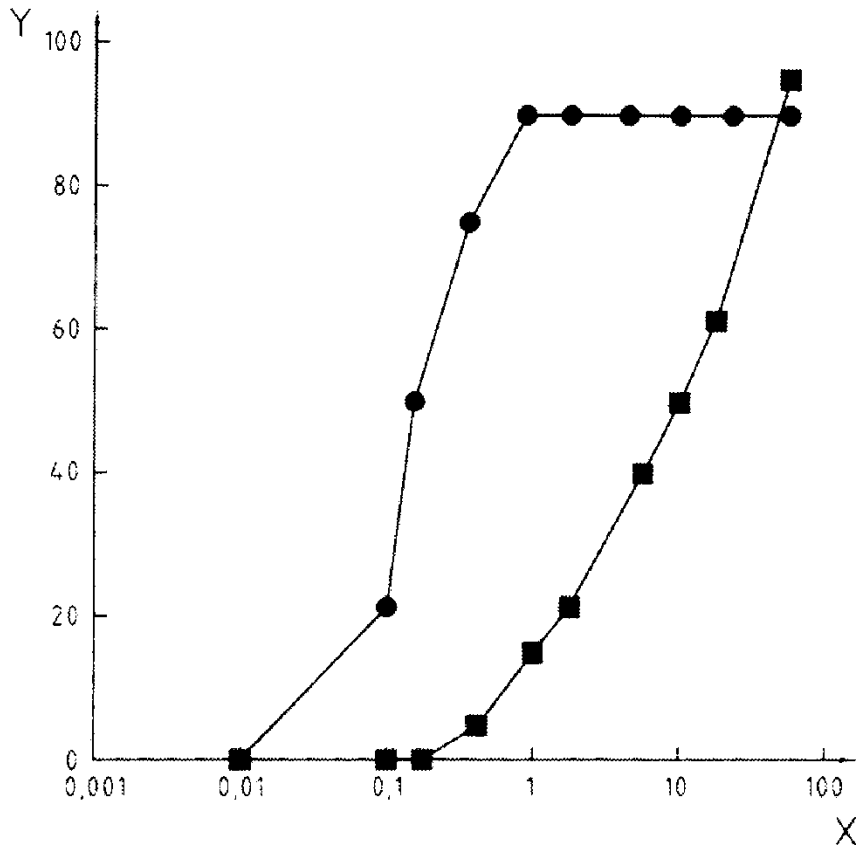


Skýringar:

- 1 prófunarilát
- 2 súrefnisrafskaut
- 3 súrefnismælitæki

4. viðbætur

Mynd 3: Dæmi um hömlunarferla



Skýringar:

X styrkur 3,5-díklórfenóls (mg/l)

Y hömlun (%)

■ hömlun á öndun ófrumbjarga lífvera með notkun nítrandi seyru

● hömlun á nítrun með notkun nítrandi seyru

„5) Í stað kafla C.26 komi eftirfarandi:

„C.26 VAXTARHINDRUNARPRÓFUN Á LEMNA SP.

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 221 um prófanir (2006). Henni er ætlað að meta eiturrif íðefna á ferskvatnsplöntur af ættkvíslinni *Lemna* (vatnadoppa, e. *duckweed*). Hún er byggð á fyrirliggjandi aðferðum (1.–6. heimild) en felur í sér breytingar á þeim aðferðum sem endurspegla nýlegar rannsóknir og samráð um mörg lyklatríði. Þessi prófunaraðferð hefur verið fullgilt með alþjóðlegri hringprófun (7. heimild).

2. Þessi prófunaraðferð lýsir eiturrhifaprófunum á *Lemna gibba* og *Lemna minor* en gerðar hafa verið umfangsmiklar rannsóknir á báðum tegundunum og fjallað um þær í stöðlunum sem vísað er til hér að framan. Flokkunarfræði *Lemna* spp. er erfið þar sem margvislegir svipfarar flækja hana. Þótt erfðabreytileiki í viðbrögðum við eitrefnum geti komið fram hjá *Lemna* liggja ekki fyrir næg gögn um þann breytileika til að hægt sé að mæla með tilteknu klóni til að nota í þessari prófunaraðferð. Hafa skal í huga að prófunin er ekki gerð í hreinrækt en ráðstafanir eru gerðar á ákveðnum stigum prófunarferlisins til að halda mengun frá öðrum lífverum í lágmarki.
3. Gefnar eru upplýsingar um prófun með endurnýjun prófunarlausnarinnar (hálfkyrrstaða og gegnumstreymi) og án endurnýjunar hennar (kyrrstaða). Með hliðsjón af markmiðum prófunarinnar og krafna samkvæmt reglum er mælt með að iðuga notkun hálfkyrrstöðu- og gegnumstreymisaðferða, t.d. fyrir iðefni sem glatast hratt úr lausn vegna uppgufunar, ljóssundrunar, útfellingar eða lífnidurbrots. Frekari leiðbeiningar eru gefnar í (8. heimild).
4. Skilgreiningar sem eru notaðar eru gefnar upp í 1. viðbæti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

5. Rækt í veldisvexti með einni tegund ættkvíslarinnar *Lemna* er látin vaxa í mismunandi styrk prófunariðefnisins í sjö daga. Markmið prófunarinnar er að magngreina áhrif af iðefnum á vöxt plantnanna á tímabilinu á grundvelli mats á völdum mælibreytum. Meginmælibreytan er blaðfjöldi. Að minnsta kosti ein önnur mælibreyta (heildarblaðþekja, þurrvigti eða votvigti) er líka mæld þar sem sum iðefni geta haft mun meiri áhrif á aðrar mælibreytur en blaðfjöldi. Til að magngreina áhrifin af iðefnum er vöxtur í prófunarlausninni borinn saman við vöxt í samanburðarprófun og styrkurinn, sem þarf til að valda tiltekinni x% vaxtarhindrun (t.d. 50%), er ákvarðaður og gefinn upp sem EC_x (t.d. EC_{50}).
6. Endapunktur prófunarinnar er vaxtarhindrun, gefin upp sem logruð aukning á mælibreytunni (meðaltal sértæks vaxtarhraða) meðan á váhrifátímabilinu stendur. Styrkurinn, sem veldur sértækri x% vaxtarhindrun (t.d. 50%), er ákvarðaður út frá meðaltali sértæks vaxtarhraða ræktaraða í prófunarlausnum, sem skráður var, og er gefinn upp sem E_rC_x (t.d. E_rC_{50}).
7. Í sumum löndum þarf einnig að nota svarbreytuna „afrakstur“ í þessari prófunaraðferð til að uppfylla sérstakar eftirlitskröfur. Hún er skilgreind sem mælibreyturnar við lok váhrifátímabilsins að frádrægnum mælibreytunum við upphaf váhrifátímabilsins. Styrkurinn sem veldur sértækri x% afraksturshindrun (t.d. 50%) er reiknaður út frá skráðum afrakstri í röð prófunarlausna og gefinn upp sem E_yC_x (t.d. E_yC_{50}).
8. Auk þess má ákvarða tölfraðilega minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

9. Greiningaraðferð með nægilegu næmi til að magnákvæða iðefnið í prófunarmiðlinum þarf að vera fyrirbyggjandi.
10. Upplýsingar um prófunariðefnið, sem geta verið gagnlegar við ákvörðun á skilyrðum í prófuninni, eru m.a. byggingarformúla, hreinleiki, vatnsleysni, stöðugleiki í vatni og ljósi, pK_a , K_{ow} , gufuþrýstingur og líffrjótanleiki. Vatnsleysni og gufuþrýstingur má nota til að reikna út fasta samkvæmt lögmáli Henrys en hann sýnir líkindin á umtalsverðu tapi prófunariðefnisins meðan á prófuninni stendur. Þetta gefur til kynna hvort gera skal tiltekna ráðstafanir til að takmarka það tap. Ef upplýsingar um leysni og stöðugleika prófunariðefnisins eru óljósar er mælt með því að leysni og stöðugleiki séu metin við prófunarskilyrði, þ.e. vaxtarmiðill, hitastig og lýsingarskilyrði sem verða í prófuninni.

11. Ef það er sérstaklega mikilvægt að stjórna sýrustigi prófunarmiðilsins, t.d. við prófanir á málmum eða íðefnum sem eru óstöðug fyrir vatnsrofi, er mælt með að bæta jafnalausn í vaxtarmiðilinn (sjá 21. lið). Frekari leiðbeiningar um prófun á íðefnum sem hafa eðlisefnafræðilega eiginleika sem gerir erfitt um vik að framkvæma prófunina eru í (8. heimild).

GILDI PRÓFUNARINNAR

12. Til að prófunin teljist gild þarf blaðfjöldi í samanburðarprófun að hafa tvöfaldast á innan við 2,5 dögum (60 klst.) sem samsvarar u.þ.b. sjöfaldri aukningu á sjö dögum og því að meðaltal sértæks vaxtarhraða sé 0.275 d^{-1} . Hægt er að ná þeirri viðmiðun í kyrrstöðuprófun með því að nota miðilinn og prófunarskilyrðin sem lýst er í þessari prófunaraðferð (5. heimild). Einnig er talið að hægt sé að ná þessari viðmiðun í hálfkyrrstöðuprófun og gegnumstreymisprófun. Útreikningar á tvöföldunartímanum eru sýndir í 49. lið.

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

13. Nota má viðmiðunariðefni, s.s. 3,5-díklórphenól sem er notað í alþjóðlegu hringprófuninni (7. heimild), til eftirlits með prófunarferlinu. Mælt er með því að prófa viðmiðunariðefni a.m.k. tvisvar á ári eða, ef prófanir eru gerðar sjaldnar, samhliða ákvörðun á eiturhrifum prófunariðefnis.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

14. Öll tæki sem komast í snertingu við prófunarmiðilinn skulu vera úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Glerbúnað, sem notaður er fyrir ræktun og prófun, skal hreinsa af mengandi íðefnum sem gætu lekið út í prófunarmiðilinn og á hann að vera dauðhreinsaður. Prófunarkerin skulu vera nógu víð til að blöð mismunandi sambúa í samanburðarkerjunum geti vaxið án þess að skarast í lok prófunarinnar. Það skiptir ekki máli þótt ræturnar snerti botn prófunarkerjanna en mælt er með því að lágmarksdýpt hvers kers sé 20 mm og lágmarksrúmmál 100 ml. Val á prófunarkerjum hefur ekki afgerandi áhrif, að því tilskildu að þessi skilyrði séu uppfyllt. Bikarglós úr gleri, kristöllunarskálur eða ræktunarskálur úr gleri með hæfileg stærðarmál hafa öll reynst vel. Prófunarkerin verða að vera lokuð til að lágmarka uppgufun og mengun fyrir slysi en þó þannig að nauðsynleg loftskipti verði. Hentug prófunarker og einkum lokin mega ekki varpa skugga eða valda breytingum á litrófseiginleikum ljóssins.
15. Ekki skal geyma ræktirnar og prófunarkerin saman. Þess vegna er best er að nota aðskilda ræktunarklefa með umhverfisstillingum, ræktunarkassa eða herbergi. Lýsingu og hitastigi þarf að vera hægt að stjórna og halda stöðugu (sjá 35.–36. lið).

Prófunarlífvera

16. Lífveran, sem notuð er í þessa prófun, er annaðhvort *Lemna gibba* eða *Lemna minor*. Stuttar lýsingar á þeim tegundum vatnadoppu sem hafa verið notaðar til eiturhrifaprófana er að finna í 2. viðbæti. Hægt er að fá plöntur frá stofnasafni, annarri rannsóknarstofu eða úr náttúrunni. Ef plönturnar eru teknar úr náttúrunni skal rækta þær í sama miðli og notaður verður við prófunina í a.m.k. átta vikur fyrir notkun. Þau náttúrusvæði sem stofnræktir eru teknar af verða að vera laus við augljósar mengunaruppsprettur. Ef plönturnar eru fengnar frá annarri rannsóknarstofu eða úr stofnasafni skal rækta þær á sama hátt í a.m.k. þrjár vikur. Uppruni plantnanna, tegundanna og klóna (ef hann er þekkur), sem notuð eru til prófunarinnar, skal alltaf tiltekinn.
17. Nota skal rækt með einni tegund sem er sýnilega laus við mengun af öðrum lífverum, s.s. þörungum og frumdýrum. Heilbrigðar plöntur af *L. minor* samanstanda af sambúum sem hafa tvö til fimm blöð en heilbrigð sambú *L. gibba* geta haft allt að því sjö blöð.
18. Gæði og einsleitni plantnanna, sem notaðar eru í prófuninni, hafa veruleg áhrif á niðurstöður prófunarinnar og því ætti að velja þær af kostgæfni. Nota skal ungar plöntur sem vaxa hratt og eru án sýnilegra vefjaskemmda eða óeðlilegs litar (gulnunar). Gæði sambúanna má meta eftir því hve mörg þeirra hafa a.m.k. tvö blöð. Mikill fjöldi stakra blaða bendir til álags af umhverfisvöldum, t.d. vegna takmarkaðrar næringar, og ekki skal nota plöntur úr þannig sambúum í prófuninni.

Ræktun

19. Til að draga úr vinnu við viðhald rækta (t.d. á tímabilum þegar ekki er ráðgert að gera prófanir á *Lemna*) er hægt að hafa ræktirnar við minnkaða birtu og lægra hitastig. (4 — 10 °C). Upplýsingar um ræktun eru gefnar í 3. viðbæti. Ef sýnileg merki eru um mengun af völdum þörunga eða annarra lífvera getur þurft að taka undirsýni af *Lemna*-blöðum, dauðhreinsa yfirborð þess og færa það í nýjan miðil (sjá 3. viðbæti). Í því tilviki skal fleygja leifunum af menguðu ræktinni.
20. Nægilegur fjöldi sambúa er færður með smitgát í nýjan, dauðhreinsaðan miðil, a.m.k. sjö dögum fyrir prófunina, og ræktaður í 7–10 daga við prófunarskilyrðin.

Prófunarmiðill

21. Mælt er með mismunandi miðlum fyrir *Lemna minor* og *Lemna gibba*, eins og lýst er hér á eftir. Íhuga skal vandlega hvort bæta ætti sýrustigsjafnalausn í prófunarmiðilinn (MOPS (4-morfólinprópansúlfonsýra, CAS-nr: 1132-61-2) í miðilinn fyrir *L. minor* og NaHCO₃ í miðilinn fyrir *L. gibba*) ef grunur leikur á að hann gæti hvarfast við prófunariðefnið og haft áhrif á eiturhrif þess. Steinberg-miðill (9. heimild) er einnig viðunandi, að því tilskildu að gildisviðmiðanirnar séu uppfylltar.
22. Mælt er með breyttri gerð sænska, staðlaða *Lemna* vaxtarmiðilsins (Swedish standard, SIS) til ræktunar og prófunar á *L. minor*. Samsetning þessa miðils er gefin upp í 4. viðbæti.
23. Mælt er með 20X—AAP-vaxtarmiðlinum, sem lýst er í 4. viðbæti, til ræktunar og prófunar á *L. gibba*.
24. Steinberg-miðill, sem lýst er í 4. viðbæti, er einnig nothæfur fyrir *L. minor* en einnig má nota hann fyrir *L. gibba*, að því tilskildu að gildisviðmiðanirnar séu uppfylltar.

Prófunarlausnir

25. Prófunarlausnir eru yfirleitt útbúnar með því að þynna stofnlausn. Oftast eru stofnlausnir með prófunariðefninu búnar til með því að leysa íðefnið upp í vaxtarmiðli.
26. Venjulega ætti mesti, prófaði styrkur prófunariðefnisins ekki að vera meiri en vatnsleysni íðefnisins við prófunarskilyrðin. Þó skal hafa í huga að *Lemna* spp. fljóta á yfirborðinu og geta orðið fyrir váhrifum frá íðefnum sem safnast upp á skilfleti vatns og lofts (t.d. íðefni sem eru torleysanleg í vatni eða vatnsfælin eða íðefni sem eru yfirborðsvirk). Við þær aðstæður verða váhrif frá efni sem er ekki í lausninni og prófunarstyrkur getur, með hliðsjón af eiginleikum prófunariðefnisins, orðið meiri en vatnsleysnin. Að því er varðar prófunariðefni sem hafa litla vatnsleysni getur reynst nauðsynlegt að útbúa sterka stofnlausn eða dreiflausn íðefnisins með því að nota lífrænan leysi eða dreifiefni til þess að auðveldara sé að bæta réttu magni prófunariðefnisins í prófunarmiðilinn og bæta dreifingu þess og uppleysingu. Forðast skal notkun slíkra efna í lengstu lög. Notkun hjálparleysa eða dreifiefna má ekki hafa í för með sér eiturhrif fyrir plöntur. Aseton og dímetýlformamíð eru dæmi um leysa sem eru almennt notaðir og eru ekki eitradir fyrir plöntur í styrk að 100 µl/l. Ef notaður er leysir eða dreifiefni skal tilgreina lokastyrk og halda honum í lágmarki ($\leq 100 \mu\text{l/l}$) og allar meðferðarræktir og samanburðarræktir skulu innihalda sama styrk af leysi eða dreifiefni. Frekari leiðbeiningar um notkun dreifiefna eru gefnar í (8. heimild).

Prófunar- og samanburðarhópar

27. Fyrirliggjandi þekking á eiturhrifum prófunariðefnisins á *Lemna*, t.d. úr skammtastærðarprófun, koma að gagni við að velja hæfilegan prófunarstyrk. Í endanlegu eiturhrifaprófuninni skulu að jafnaði vera a.m.k. fimm prófunarstyrkleikar í jafnhlutfallaröð. Æskilegt er að stuðullinn sem greinir á milli prófunarstyrkleikanna fari ekki yfir 3,2 en nota má hærra gildi ef ferill styrkháðrar svörunar er flatur. Færa skal rök fyrir því ef færri en fimm styrkleikar eru notaðir. Gera skal a.m.k. þrjár samhlíða prófanir fyrir hvern prófunarstyrkleika.

28. Eftirfarandi skal haft í huga þegar röð prófunarstyrkleika er ákveðin (í skammtastærðarprófun og/eða í endanlegu eiturhrifaprófuninni):
- Til að tryggja viðeigandi öryggismörk skal EC_x -gildið, sem ákvarðað er, liggja innan prófunarstyrkleikanna. Ef t.d. er verið að meta EC_{50} skal hæsti prófunarstyrkleikinn vera hærri en EC_{50} -gildið. Ef EC_{50} -gildið er utan við röð prófunarstyrkleikanna verða viðkomandi öryggisbil stór og því verður hugsanlega ekki unnt að meta tölfraðileg mátgæði líkansins á traustan hátt.
 - Ef markmiðið er að ákvarða minnsta styrk, sem hefur merkjanleg áhrif/styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif skal minnsti prófunarstyrkurinn vera það lítill að vöxtur sé ekki marktækt minni en í samanburðarprófuninni. Auk þess skal mesti prófunarstyrkurinn vera nógu mikill til að vöxtur sé marktækt minni en í samanburðarprófuninni. Ef þetta næst ekki verður að endurtaka prófunina með mismunandi styrkleikabili (nema mesti styrkleikinn sé við leysnimark eða hámarks-gildi styrks sem þörf er á, t.d. 100 mg/l).
29. Í hverri prófun skal gera samanburðarprófanir með sama næringamiðli, fjölda blaða og sambúa, sömu umhverfisaðstæðum og tilhögun og í prófunarkerjunum en án prófunariðefnisins. Ef notaður er hjálparleysir eða dreifiefni skal gera viðbótarsamanburðarprófun með leysinum/dreifiefninu sem notað er, í sama styrk og í kerjunum með prófunariðefninu. Fjöldi samhliða prófunarkerja (og kerja með leysi, ef við á) skal vera a.m.k. jafn, og æskilegast er að hann sé tvöfaldur, og fjöldi kerjanna sem notuð eru fyrir hvern prófunarstyrk.
30. Ef ekki er þörf á ákvörðun þess styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif má breyta prófunaráætlun þannig að styrkleikastigum sé fjölgað og samhliða prófunum á hverju styrkleikastigi fækkað. Samhliða samanburðarprófanir þurfa þó að vera a.m.k. þrjár.

Váhrif

31. Sambú, sem samanstanda af 2 til 4 sýnilegum blöðum, eru flutt úr sáningarræktinni og settar handahófskennt í prófunarkerin með smitgát. Í hverju prófunarkeri skulu vera alls 9 til 12 blöð. Fjöldi blaða og sambúa skal vera sá sami í hverju prófunarkeri. Reynslan af þessari aðferð og gögn úr hringprófunum benda til þess að þrjár samhliða prófanir fyrir hverja meðferðarprófun, þar sem í hverri samhliða prófun eru 9 til 12 blöð í upphafi, nægi til að greina mun á vexti milli meðferðarprófana sem svarar til u.þ.b. 4 til 7% vaxtarhindrunar ef vaxtarhraði er notaður til útreikninga (10–15% ef afrakstur er notaður til útreikninga) (7. heimild).
32. Til að lágmarka rúmfræðilegan mun á ljósstyrk eða hitastigi er nauðsynlegt að nota handahófskennda tilhögun við að staðsetja prófunarkerin í ræktunarkassanum. Einnig er nauðsynlegt að breyta um staðsetningu á kerjunum, annaðhvort í blokkum eða handahófskennt eftir mælingar (eða oftar).
33. Ef forprófanir á stöðugleika sýna að ekki er hægt að viðhalda styrk prófunariðefnisins (þ.e. ef mældur styrkur fellur niður fyrir 80% af mældum upphafsstyrk) meðan á prófuninni stendur (í 7 daga) er mælt með hálfkyrrstöðuprófun. Í því tilviki eru sambúin látin verða fyrir váhrifum frá nýlögðum prófunar- og samanburðarlausnum a.m.k. tvisvar sinnum meðan á prófuninni stendur (þ.e. á 3. og 5. degi). Tíðni snertingar við nýjan miðil fer eftir stöðugleika prófunariðefnisins; hugsanlega þarf að auka tíðnina til að viðhalda nokkuð stöðugum styrk mjög óstöðugra eða rokgjarnra íðefna. Við sumar aðstæður gæti þurft að nota gegnumstreymi við prófunina (8. og 10. heimild).
34. Í þessari prófunaraðferð er ekki fjallað um sviðsmynd af váhrifum vegna notkunar á laufblöð (úði), sjá þess í stað (11. heimild).

Ræktunarskilyrði

35. Nota skal stöðuga hlýja eða svala, hvíta flúrlýsingu til að veita ljósstyrk sem er valinn af bilinu 85–135 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ á mældri, virkri bylgjulengd ljóstíllifunar (400–700 nm) á punktum sem eru í sömu fjarlægð frá ljósgjafanum og *Lemna*-blöðin (samsvarar 6500–10000 lúxum). Mismunur á völdum ljósstyrk á prófunarsvæðinu skal ekki fara yfir $\pm 15\%$. Aðferðin við ljósgreiningu og ljósmælingu hefur áhrif á mæligildið, sérstaklega tegund nemans. Æskilegra er að nota kúlulaga nema (sem nema ljós frá öllum hornum fyrir ofan og neðan mæliflötinn) og hvelfda (kósínus) nema (sem nema ljós frá öllum hornum fyrir ofan mæliflötinn) en einstefnunema og það gefur hærri niðurstöður fyrir dreifða ljósgjafa eins og lýst er hér.

36. Hitastigið í prófunarkerjunum skal vera 24 ± 2 °C. pH-gildi samanburðarmiðilsins skal ekki hækka meira en sem nemur 1,5 einingum meðan á prófun stendur. Frávik sem er yfir 1,5 einingum myndi þó ekki gera prófunina ógilda ef hægt er að sýna fram á að gildisviðmiðanir séu uppfylltar. Gæta þarf að sýrustigsreki í sérstökum tilvikum, s.s. við prófun á óstöðugum iðefnum eða málmmum. Sjá frekari leiðbeiningar í (8. heimild).

Tímalengd

37. Prófuninni lýkur 7 dögum eftir að plönturnar voru færðar í prófunarkerin.

Mælingar og ákvarðanir með greiningum

38. Við upphaf prófunarinnar eru blöðin í prófunarkerjunum talin og skráð og þess gætt að framstæð, auðsjáanleg blöð séu talin með. Ákvarða þarf fjölda blaðanna, bæði þeirra sem hafa eðlilegt útlit og þeirra afbrigðilegu, við upphaf prófunarinnar, a.m.k. einu sinni á þriggja daga fresti yfir váhrifatímabilið (þ.e. a.m.k. tvisvar á 7 daga tímabilinu) og við lok prófunarinnar. Skrá skal breytingar á þroskun plantnanna, t.d. að því er varðar blaðstærð, útlit, vísbendingar um drep, gulnun eða hnúða, rof í sambúum eða minnkaða flothæfni, og lengd róta og útlit þeirra. Einnig skal tilgreina marktæka þætti í prófunarmiðlinum (t.d. óuppleyst efni, þörungavöxtur í prófunarkerinu).
39. Auk ákvörðunar á blaðfjölda meðan á prófuninni stendur skal einnig meta áhrif prófunariðefnisins á eina (eða fleiri) eftirfarandi mælibreytur:
- heildarblaðþekju,
 - þurrvigt,
 - votvigt.
40. Heildarblaðþekja hefur þann kost að hægt er að ákvarða hana fyrir hvert prófunar- og samanburðarkerin í upphafi prófunarinnar, meðan á henni stendur og við lok hennar. Ákvarða skal þurr- eða votvigt í upphafi prófunarinnar með sýni af sánigarrækt, sem er dæmigerð fyrir þá sem er notuð til að hefja prófunina, og við lok hennar með plöntunum úr öllum prófunar- og samanburðarkerjunum. Ef blaðþekja er ekki mæld skal velja þurrvigt fremur en votvigt.
41. Hægt er að ákvarða heildarblaðþekju, þurrvigt og votvigt á eftirfarandi hátt:
- Heildarblaðþekja:* Hægt er að ákvarða heildarblaðþekju allra sambúanna með myndgreiningu. Ná má útlínmynd af prófunarkerinu og plöntunum með því að nota myndupptökuvél (þ.e. með því að setja kerid á ljóskassa) og færa svo myndina í stafrænt form. Með því að kvarða flöt form á þekktu svæði er svo hægt að ákvarða heildarblaðþekjuna í prófunarkerinu. Mikilvægt er að undanskilja þá truflun sem brún prófunarkersins veldur. Önnur, en erfðari aðferð, er að taka ljósrit af prófunarkerjunum og plöntunum, klippa út útlínmyndina af sambúunum og ákvarða þekjuna með flatarmálmæli fyrir lauf eða millimetrappír. Aðrar aðferðir (t.d. þyngdarhlutfall pappirsins í útlínmyndunum af sambúunum á móti öllu yfirborðinu) geta einnig verið viðeigandi.
 - Þurrvigt:* Öll sambú eru tekin úr hverju og einu prófunarkerjanna og skoluð með eimuðu eða afjönuðu vatni. Þau eru þerruð til að fjarlægja umframvatn og svo þurrkuð við 60 °C þar til þyngdin helst stöðug. Rótartætlur skulu teknar með. Þurrvigt skal gefin upp með nákvæmni upp á minnst 0,1 mg.
 - Votvigt:* Öll sambú eru flutt í forvigtuð pólýstýrentilraunaglós (eða tilraunaglós úr öðru hvarftregu efni) með litlum (1 mm) götum í hvelfdum botnunum. Síðan eru tilraunaglóssett í skilvindu við 3 000 snún./mín. í 10 mínútur við stofuhita. Tilraunaglóssett sambúunum, sem nú eru orðin þurr, eru vigtuð aftur og votvigtin reiknuð út með að draga þyngd tóma tilraunaglassins frá.

Tíðni mælinga og ákvarðana með greiningum

42. Ef tilhögunin er kyrrstöðuprófun skal mæla sýrustig hvírrar meðferðarprófunar í upphafi og við lok hennar. Ef tilhögunin er hálfkyrrstöðuprófun skal mæla sýrustig í hverri lotu af „nýrri“ prófunarlausn fyrir endurnýjunina og einnig í samsvarandi „gömlum“ lausnum.

43. Ljósstyrkur skal mældur í ræktunarklefanum, ræktunarkassanum eða herberginu á punktum sem eru í sömu fjarlægð frá ljósgjafanum og *Lemna*-blöðin. Mælingar skulu gerðar a.m.k. einu sinni meðan á prófuninni stendur. Hitastigið í miðlinum í staðgengilskeri, sem er haft við sömu skilyrði í ræktunarklefanum, ræktunarkassanum eða herberginu, skal skráð a.m.k. einu sinni á dag.
44. Í prófuninni er styrkur prófunariðfnisins ákvarðaður með hæfilegu millibili. Lágmarkskrafa í kyrrstöðuprófun er að ákvarða styrkinn við upphaf og lok prófunarinnar.
45. Í hálfkyrrstöðuprófun, þar sem þess er ekki vænst að styrkur prófunariðfnisins haldist innan $\pm 20\%$ af nafnstyrk, er nauðsynlegt að greina allar nýlagaðar prófunarlausnir og sömu lausnir við hverja endurnýjun (sjá 33. lið). Í prófunum, þar sem mældur upphafsstyrkur prófunariðfnis liggur utan markanna $\pm 20\%$ af nafnstyrk en sýna má fram á endurtekingarnákvæmni og stöðugleika upphaflegs styrkleika (þ.e. innan markanna 80–120% af upphaflegum styrkleika), þarf þó ekki að gera efnafræðilegar greiningar nema á hæsta og lægsta styrk. Í öllum tilvikum þarf ákvörðun á styrkleikum prófunariðfnis fyrir endurnýjun aðeins að fara fram í einu samhliða prófunarkeri fyrir hvern prófunarstyrk (eða samsettu innihaldi kerja í samhliða prófuninni).
46. Ef um er að ræða gegnumstreymisprófanir hentar að nota svipaða sýnatökuáætlun og lýst er fyrir hálfkyrrstöðuprófanir, þ.m.t. greiningar við upphaf prófunarinnar, þegar hún er hálfuð og við lok hennar, en mælingar á „gömlum“ lausnum eiga ekki við í þessu tilviki. Í prófunum af þessari tegund skal athuga streymi þynningarefnis og prófunariðfnis eða stofnlausn prófunariðfnisins daglega.
47. Ef unnt er að sýna fram á að styrkur prófunariðfnis í lausn hafi örugglega haldist innan markanna $\pm 20\%$ af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk í allri prófuninni er heimilt að greining á niðurstöðunum grundvallist hvort heldur sem er á nafngildi eða mældu upphafsgildi. Ef frávik frá nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk er ekki innan $\pm 20\%$ skal byggja greiningu á niðurstöðunum á faldmeðaltali styrks meðan á vahrifum stendur eða á líkönum sem lýsa lækku á styrk prófunariðfnisins (8. heimild).

Markprófun

48. Við sumar aðstæður, t.d. ef forprófun bendir til þess að prófunariðfnið hafi engin eiturrhif við styrk að 100 mg/l eða að leysnimörkum sínum í prófunarmiðlinum (eftir því hvort er lægra) má gera markprófun með samanburði svörunar í samanburðarhópi og einum meðferðarhópi (100 mg/l eða styrkur sem er jafn leysnimörkum). Eindregið er mælt með að prófunin sé studd greiningu á styrk váhrifa. Öll prófunarskilyrði og gildisviðmiðanir, sem lýst hefur verið, eiga við um markprófun, að því undanteknu að fjöldi samhliða meðferðarprófana skal tvöfaldaður. Greina má vöxt í samanburðar- og meðferðarhópunum með tölfræðiprófi til að bera saman meðaltöl, t.d. t-próf.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Tvöföldunartími

49. Til að ákvarða tvöföldunartíma blaðfjölda (T_d) og samkvæmni rannsóknarinnar við þá gildisviðmiðun (12. liður) er notuð eftirfarandi formúla með gögnum um samanburðarkerin:

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

þar sem μ er meðaltal sértæks vaxtarhraða sem er ákvarðað eins og lýst er í 54.–55 lið.

Svarbreytur

50. Tilgangur prófunarinnar er að ákvarða áhrif prófunaríðefnisins á vöxt *Lemna*-plantna. Þar eð forgangsráði og þarfir vegna eftirlits eru mismunandi eftir löndum er tveimur svarbreytum lýst í þessari prófunaraðferð. Áhrifin skulu metin með báðum svarbreytum, a) og b), sem lýst er hér á eftir, til þess að niðurstöður úr prófununum séu tækar í öllum löndum.
- a) *Meðaltal sértæks vaxtarhraða*: Þessi svarbreyta er reiknuð út á grunni breytinga á logrum blaðfjölda og auk þess á grunni breytinga á logrum annarra mælibreyta (heildarblaðþekju, þurrvigt eða votvigt) á tímabili (gefið upp sem dagar) í samanburðarprófunum og í hverjum meðferðarhóp. Það er stundum kallað hlutfallslegur vaxtarhraði (12. heimild).
- b) *Afrakstur*: Þessi svarbreyta er reiknuð út á grunni breytinga á blaðfjölda og auk þess á grunni breytinga á öðrum mælibreytum (heildarblaðþekju, þurrvigt eða votvigt) í samanburðarprófunum og í hverjum meðferðarhóp að lokum prófunarinnar.
51. Tekið skal mið af því að gildin fyrir eiturrhif, sem reiknuð eru út með þessum tveimur svarbreytum, eru ekki samanburðarhæf og þann mun þarf að hafa í huga þegar niðurstöður prófunarinnar eru notaðar. Vegna stærðfræðilegs grundvallar viðkomandi nálgana verða EC_x gildi, sem byggjast á meðaltali sértæks vaxtarhraða (E_rC_x), yfirleitt hærri en niðurstöður sem byggðar eru á afrakstri (E_yC_x), ef prófunarskilyrðum þessarar prófunaraðferðar er fylgt. Þetta skal ekki túlkað sem munur á næmi svarbreytnanna tveggja, heldur einfaldlega þannig að gildin séu stærðfræðilega frábrugðin hvoru öðru. Hugtakið „meðaltal sértæks vaxtarhraða“ er byggt á almennu veldisvaxtarmynstri vatnadoppu í ótakmarkaðri rækt þar sem eiturrhif eru metin á grunni áhrifa þeirra á vaxtarhraða og eru ekki háð altæku gildi sértæks vaxtarhraða samanburðarrættarinnar, ferli styrkháðrar svörunar eða prófunartímabilinu. Niðurstöður byggðar á svarbreytunni „afrakstur“ eru á hinn bóginn háðar öllum þessum breytum. E_yC_x er háð sértækum vaxtarhraða þeirra tegunda vatnadoppu sem notaðar eru í hverri prófun og sértækum hámarksvaxtarhraða sem getur verið mismunandi milli tegunda og jafnvel mismunandi klóna. Ekki skal nota þá svarbreytu til samanburðar á næmi fyrir eiturefnum meðal vatnadoppu tegunda eða jafnvel mismunandi klóna. Þrátt fyrir að notkun meðaltals sértæks vaxtarhraða til að meta eiturrhif sé vísindalega æskileg felur þessi prófunaraðferð einnig í sér mat á eiturrhifum sem byggt er á afrakstri til að uppfylla núgildandi ákvæði laga og reglna í sumum landanna.
52. Byggja skal mat á eiturrhifum á blaðfjölda og á einni annarri mælibreytu (heildarblaðþekju, þurrvigt eða votvigt) þar sem sum íðefni geta haft meiri áhrif á aðrar mælibreytur en fjölda blaða. Þau áhrif myndu ekki greinast ef aðeins væru gerðir útreikningar á blaðfjölda.
53. Fjöldi blaða, sem og aðrar skráðar mælibreytur, þ.e. heildarblaðþekja, þurrvigt eða votvigt, eru settar fram í töflu ásamt styrkleikum prófunaríðefnisins fyrir hverja mælingu. Greining gagna sem á eftir fylgir, t.d. til að meta minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif, styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif eða EC_x , skal byggjast á gildum hverrar samhlíða prófunar en ekki útreiknuðu meðaltali fyrir hvern meðferðarhóp.

Meðaltal sértæks vaxtarhraða

54. Meðaltal sértæks vaxtarhraða fyrir tiltekið tímabil er reiknað út sem logruð aukning vaxtarbreytanna – fjölda blaða og einni annarri mælibreytu (heildarblaðþekju, þurrvigt eða votvigt) – með eftirfarandi formúlu, fyrir hverja samhlíða samanburðarprófun og samhlíða meðferðarprófun:

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

þar sem:

— μ_{i-j} : er meðaltal sértæks vaxtarhraða frá tímanum i til j

— N_i : er mælibreyta í prófunar- eða samanburðarkeri á tímanum i

- N_j : er mælibreyta í prófunar- eða samanburðarkeri á tímanum j
- t : er tímabilið frá i til j

Reiknað er út meðalgildi vaxtarhraða fyrir hvern meðferðar- og samanburðarhóp, ásamt dreifnimati.

55. Reikna skal meðaltal sértæks vaxtarhraða fyrir allt prófunartímabilið (tíminn „i“ í formúlunni hér á undan er upphaf prófunarinnar og tíminn „j“ er lok prófunarinnar). Reiknað er út meðalgildi fyrir meðaltal sértæks vaxtarhraða ásamt dreifnimati fyrir hvern prófunarstyrk og samanburðarprófun. Einnig skal ákvarða vaxtarhraðann þrep fyrir þrep til að meta áhrif prófunariðefnisins á váhrifatímabilinu (t.d. með því að skoða log-umbreytta vaxtarferla). Marktækur munur á vaxtarhraðanum þrep fyrir þrep og meðalvaxtarhraðanum bendir til fráviks frá stöðugum veldisvexti og því ástæða til að rannsaka vaxtarferlana nánar. Í því tilviki væri varfærnað að bera saman sértækan vaxtarhraða í meðferðarræktum á hámarkshindrunartíma og sama tímabil í samanburðarræktun.
56. Hlutfall hindrunar á vaxtarhraða (I_r) á hverju styrkleikastigi prófunarefnis (meðferðarhópur) er reiknaður með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

- $\% I_r$: er hlutfall hindrunar í meðaltali sértæks vaxtarhraða
- μ_C : er meðalgildi μ í samanburðarprófuninni
- μ_T : er meðalgildi μ í meðferðarhópnum

Afrakstur

57. Áhrif á afrakstur eru ákvörðuð á grunni tveggja mælibreytna, blaðfjölda og einnar annarrar mælibreytu (heildarblaðþekju, þurrvigtar eða votvigtar), úr hverju prófunarkeri við upphaf og endi prófunarinnar. Til að finna þurrvignt eða votvignt er ákvörðun á upphafslífmassa byggð á blaðsýni sem er tekið úr sömu lotu og notuð var til að sá í prófunarkerin (sjá 20. lið.). Reiknað er út meðalgildi afraksturs ásamt dreifnimati fyrir hvern prófunarstyrk og samanburðarprófun. Hægt er að reikna út meðalhundraðshlutfall hindrunar á afrakstri ($\% I_y$) fyrir hvern meðferðarhóp með eftirfarandi hætti:

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

þar sem:

- $\% I_y$: er hundraðshlutfall minnkunar á afrakstri
- b_c : er lokalífmassi að fráðregnum upphafslífmassa í samanburðarhópnum
- b_r : er lokalífmassi að fráðregnum upphafslífmassa í meðferðarhópnum

Ferlar styrkháðrar svörunar teiknaðir

58. Teikna skal ferla styrkháðrar svörunar, sem sýna meðalvaxtarhindrun svarbreytunnar (I_r , eða I_y reiknuð eins og sýnt er í 56. eða 57. lið), og lograðan styrk prófunariðefnisins.

Mat á EC_x

59. Mat á EC_x (t.d. EC_{50}) skal byggjast á meðaltali sértæks vaxtarhraða (E_rC_x) og afrakstri (E_yC_x) sem hvort um sig skal byggjast á blaðfjölda og einni viðbótarmælbreytu (heildarblaðþekju, þurrviggt eða votviggt). Ástæðan fyrir því er sú að til eru prófunariðefni sem hafa ekki sömu áhrif á blaðfjölda og aðrar mælbreytur. Æskilegir mælipættir fyrir eiturrifin eru því EC_x -gildin fjögur sem reiknuð eru út fyrir hvert hindrunarstig x : E_rC_x (blaðfjöldi); E_rC_x (heildarblaðþekja, þurrviggt eða votviggt); E_yC_x (blaðfjöldi) og E_yC_x (heildarblaðþekja, þurrviggt eða votviggt).

Tölfræðiaðferðir

60. Markmiðið er að fá fram megindlegt samband styrks og svörunar með aðhvarfsgreiningu. Hægt er að nota vegið línulegt aðhvarf þegar færsla svörunargagnanna hefur verið línugerð – t.d. probit- eða logit- eða Weibull-einingar (13. heimild), en ólínulegar aðhvarfsgreiningar eru æskilegri aðferðir sem ráða betur við óhjákvæmilegar misfellur í gögnum og frávik frá jafnri dreifingu. Nærri núlli, eða algerrri vaxtarhindrun, geta slíkar misfellur magnast við umbreytinguna og truflað greininguna (13. heimild). Tekið skal mið af því að staðalaðferðir við greiningu sem nota probit-, logit- eða Weibull-umbreytingar eru ætlaðar til notkunar á skammtabundnum gögnum (t.d. dánartíðni eða lifun) og þeim þarf að breyta til að þær nái yfir gögn um vaxtarhraða eða afrakstur. Sértækar aðferðir við ákvörðun á EC_x -gildum með samfelldum gögnum má finna í (14.–16. heimild).
61. Nota skal feril styrks á móti svörun til útreikninga á punktmat EC_x -gilda fyrir allar svarbreytur sem þarf að greina. Ákvarða skal 95% öryggismörk fyrir hvert mat, ef unnt er. Meta skal mátgæði gagna við aðhvarfslíkanið, annaðhvort myndrænt eða tölfræðilega. Gera skal aðhvarfsgreiningar með svörun hverrar samhliða prófunar fyrir sig, ekki með meðaltali meðferðarhópa.
62. Einnig má fá mat á EC_{50} -gildum og öryggismörk með því að nota línulegan innreikning og nálgun með handahófsúrtökum (17. heimild) ef fyrirliggjandi aðhvarfslíkön/-aðferðir henta ekki fyrir gögnin.
63. Nauðsynlegt er að bera saman meðaltal meðferðarprófana með dreifnigreiningu til að fá mat á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif, og þar með styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif. Meðaltalið fyrir hvern styrkleika skal svo borið saman við meðaltal samanburðarins með viðeigandi aðferð þar sem notaður er margfaldur samanburður eða leitniþrófun. Prófanir samkvæmt Dunnett eða Williams geta komið að gagni (18.–21. heimild). Nauðsynlegt er að meta hvort forsenda dreifnigreiningar um einsleitni dreifninnar stenst. Matið er hægt að framkvæma myndrænt eða með hefðbundnu prófi (22. heimild). Prófanir Levens eða Bartlett's eru viðeigandi. Ef forsendan um einsleitni dreifni stenst ekki er stundum hægt að leiðrétta slíkt með lograðri umbreytingu gagnanna. Ef misleitni dreifninnar er mjög mikil, og ekki hægt að leiðrétta hana með umbreytingu, má taka til athugunar að gera greiningu með aðferðum eins og Jonkheere-leitniþrófun með stíglækkun. Viðbótarleiðbeiningar um ákvörðun styrks, sem hefur engin merkjanleg áhrif, má finna í (16. heimild).
64. Vegna nýlegra framfara í vísindum er mælt með að hætt verði að nota hugtakið „styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif“ (NOEC) og nota í staðinn punktmat EC_x -gilda, byggt á aðhvarfi. Ekki er búið að fastsetja viðeigandi x -gildi fyrir þetta *Lemna*-próf. Á bilinu 10–20% virðist þó vera rétt svið (með hliðsjón af svarbreytunni sem valin er) og æskilegt er að bæði EC_{10} og EC_{20} séu tilgreind.

Skýrslugjöf

65. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunariðefni:

- eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar, þ.m.t. vatnsleysnimörk,
- gögn um efnafræðilega sanngreiningu (t.d. CAS-númer), þ.m.t. hreinleika (öhreinindi).

Prófunartegund:

- vísindaheiti, klón (ef þekkt) og uppruni.

Prófunarskilyrði:

- prófunaraðferð (t.d. kyrrstöðu-, hálfkyrrstöðuprófun eða gegnumstreymi),
- upphafsdagur prófunarinnar og hve lengi hún stendur,
- prófunarmiðill,
- lýsing á tilhögun tilraunar: prófunarker og lok, rúmmál lausna, fjöldi sambúa og blaða á prófunarker við upphaf prófunarinnar,
- prófunarstyrkur (nafnstyrkur og mældur styrkur, eftir því sem við á) og fjöldi samhliða prófana fyrir hvern styrk,
- aðferðir við tilreiðslu stofnlausna og prófunarlausna, þ.m.t. öll notkun leysa eða dreifiefna,
- hitastig meðan á prófun stendur,
- ljósgjafi, ljósstyrkur og einsleitni,
- sýrustig prófunar- og samanburðarmiðilsins,
- styrkur prófunariðefnis og greiningaraðferð með viðkomandi gæðamatsgögnum (fullgildingarrannsóknir, staðalfrávik eða öryggismörk greininga),
- aðferðir við ákvörðun á blaðfjölda og öðrum mælibreytum, t.d. þurrvig, votvig eða blaðþekju,
- öll frávik frá prófunaraðferðinni.

Niðurstöður:

- óunnin gögn: blaðfjöldi og aðrar mælibreytur í hverri prófun og samanburðarkeri við hverja mælingu og greiningu,
- meðaltal og staðalfrávik fyrir hverja mælibreytu,
- vaxtarferlar fyrir hvern styrk (mælt er með lograðri mælibreytu, sjá 55. lið),
- tvöföldunartími/vaxtarhraði í samanburðarsýninu, byggður á blaðfjölda,
- útreikningar á svarbreytum fyrir hverja samhliða meðferðarprófun, með meðalgildum og fráviksstuðli fyrir samhliða prófanir,
- myndræn útfærsla á sambandi styrks og áhrifa,
- mat á endapunktum eiturrifa fyrir svarbreytur, t.d. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, og viðkomandi öryggisbil. Minnsti styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif og/eða styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif, ef þeir hafa verið reiknaðir út, og tölfræðiaðferðirnar sem notaðar voru til að ákvarða þá,
- ef notuð var dreifnigreining: umfang áhrifanna sem greindust (t.d. minnsti marktækur munur),
- öll vaxtarörvun sem fram kom í öllum meðferðarprófunum,
- öll sýnileg merki um eitrun fyrir plöntur, sem og mælingar á prófunarlausnum,
- umfjöllun um niðurstöðurnar, þ.m.t. öll áhrif sem frávik frá prófunaraðferðinni hafa á niðurstöðu prófunarinnar.

HEIMILDIR

- 1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- 2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., “Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8pp.
- 3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l’inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
- 4) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).
- 5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 - 120 pp.
- 6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- 7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.
- 8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- 9) 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.
-

*1. viðbætur***Skilgreiningar**

Eftirfarandi skilgreiningar og skammstafanir eru notaðar í þessari prófunaraðferð:

Lífmassi er þurrvigt lifandi efnis sem er í stofni. Í þessari prófun eru líka oft mældir staðgenglar fyrir lífmassann, s.s. blaðfjöldi eða blaðþekja, og því vísar notkun hugtaksins „lífmassi“ líka til þessara staðgöngumælinga.

Íðefni er efni eða blanda.

Fölvasýki er gulnun blaðvefjanna.

Klón er lífvera eða fruma sem verður til úr einum einstaklingi með kynlausri æxlun. Einstaklingar úr sama klóni eru því eins erfðafræðilega.

Þyrping er safn móður- og dótturblaða (yfirleitt 2–4) sem eru föst saman. Stundum kallað planta.

EC_x er sá styrkur prófunaríðefnisins, sem er uppleyst í prófunarmiðlinum, sem veldur $x\%$ (t.d. 50%) samdrætti í vexti hjá **Lemna** á tilgreindu váhrifátímabili (frávik frá fullum eða eðlilegum prófunartíma skulu tekin fram með skýrum hætti). Til ótvíræðrar merkingar á EC-gildum, sem leidd eru af vaxtarhraða eða afrakstri, er táknið „ E_xC “ notað fyrir vaxtarhraða og E_xC fyrir afrakstur, að viðbætti mælibreytunni sem notuð er, t.d. E_1C (blaðfjöldi).

Gegnumstreymi er prófun þar sem prófunarlausnunum er stöðugt skipt út fyrir nýjar.

Blað er einn/stakur hluti vatnadoppuplöntunnar sem líkist blaði. Það er smæsta einingin, þ.e. einstaklingur sem getur fjölgað sér.

Hnúðótt eru blöð sem eru með hnúða eða bólgin.

Vöxtur er aukning á mælibreytunni meðan á prófunartímanum stendur, t.d. á blaðfjölda, þurrvigt, blautvigt eða blaðþekju.

Vaxtarhraði (meðaltal sértæks vaxtarhraða) er logruð aukning lífmassans meðan á váhrifátímabilinu stendur.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) er minnsti styrkur þar sem íðefnið reynist, innan tilgreinds váhrifátímabils, draga úr vexti á tölfræðilega marktækan hátt (við $p < 0,05$) miðað við samanburðarhóp. Í öllum prófunum, þar sem styrkur er meiri en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif, skal hann á hinn bóginn valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum, merkjanlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Sé ekki hægt að uppfylla þessi tvö skilyrði skal skýra til fulls hvernig staðið var að vali á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (og þar með vali á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif).

Mælibreytur eru hverjar þær breytur sem eru mældar, með hjálp einnar svarbreytu eða fleiri, til að lýsa endapunkti prófunarinnar. Í þessari aðferð eru mælibreyturnar blaðfjöldi, blaðþekja, votvigt og þurrvigt.

Rækt með einni tegund er rækt með einni tegund plantna.

Drep er dauður (þ.e. hvítur eða vatnssósa) blaðvefur.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif er sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif

Svipfar er sýnileg einkenni lífveru sem ákvarðast af samspili gena hennar og umhverfis.

Svarbreyta eru breytur sem eru notaðar til að meta eiturrhif og eru leiddar út af öllum mældum mælipáttum sem lýsa lífmassa með mismunandi reikniáðferðum. Í þessari prófunaraðferð eru vaxtarhraði og afrakstur svarbreytur sem eru leiddar út af mælibreytum s.s. blaðfjölda, blaðþekju, votvigt eða þurrvigt.

Hálfkyrrstöðuprófun (endurnýjun) er prófun þar sem prófunarlausnin er endurnýjuð með ákveðnu millibili meðan á prófuninni stendur.

Kyrrstöðuprófun er prófunaraðferð þar sem prófunarlausn er ekki endurnýjuð meðan á prófuninni stendur.

Prófunariðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Endapunktur prófunarinnar lýsir almennum þætti sem prófunariðefnið breytir miðað við samanburðarprófanir og sem er tilgangur prófunarinnar. Í þessari prófunaraðferð er endapunktur prófunarinnar vaxtarhindrun sem hægt er að gefa upp með mismunandi svarbreytum sem eru byggðar á einni mælibreytu eða fleiri.

Prófunarmiðill er tilbúni ræktunarmiðillinn í heild sinni sem prófunarplönturnar vaxa í meðan váhrifin frá prófunariðefninu standa yfir. Yfirleitt er prófunariðefnið uppleyst í prófunarmiðlinum.

Afrakstur er gildi mælibreytu sem lýsir lífmassanum við lok váhrifatímabilsins að frádregnu gildi mælibreytunnar við upphaf váhrifatímabilsins.

2. viðbætur

Lýsing á Lemna spp.

Vatnplantan sem er almennt nefnd vatnadoppa, *Lemna* spp., tilheyrir Lemnaceae-ættinni en í fjórum ættkvísla hennar eru nokkrar tegundir sem til eru um allan heim. Tæmandi lýsingar eru til á mismunandi útliti þeirra og flokkunarfræði (1.–2. heimild). *Lemna gibba* og *L. minor* eru tegundir sem eru dæmigerðar fyrir tempruð svæði og eru almennt notaðar í eiturhrifaprófanir. Báðar tegundirnar hafa skífulaga stilk (blað), sem er annaðhvort fljótandi eða í kafi, og mjög mjóa rót sem á upptök sín í miðri neðri hlið hvers blaðs. *Lemna* spp. blómstra sjaldan og plönturnar fjölga sér með því að mynda ný blöð á kynlausan hátt (3. heimild). Yngri plönturnar eru oftast ljósari en þær eldri, hafa styttri rætur og samanstanda af tveimur til þremur misstórum blöðum. Þar sem *Lemna* eru smávaxnar, einfaldar í byggingu, fjölga sér með kynlausri æxlun og hafa stuttan kynslóðartíma eru plöntur af þessari ættkvísl mjög hentugar fyrir prófanir á rannsóknarstofum (4.–5. heimild).

Þar sem líklegt er að næmi sé breytilegt eftir tegundum er samanburður á næmi aðeins gildur ef hann er gerður innan tegunda.

Dæmi um *Lemna*-tegundir sem hafa verið notaðar til prófana: Tilvísanir í tegundir

Lemna aequinotialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinotialis* 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. (á sænsku).

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.

Tegundasöfn *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria

Department of Botany, University of Toronto

Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2

Sími: +1-416-978-3641

Bréfasími: +1-416-978-5878

Netfang: jacreman@botany.utoronto.ca

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

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SWEDEN
Sími: +46 8 674 7240
Bréfsími (+46) 8 674 7636

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

HEIMILDIR

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

*3. viðbætur***Viðhald stofnræktar**

Hægt er að viðhalda stofnræktum lengi við lægri hitastig (4–10 °C) án þess að það þurfi að stofna til þeirra að nýju. Nota má sama *Lemma*-vaxtarmiðil og notaður er í prófanir en nota má annan næringarríkan miðil fyrir stofnræktir.

Nokkrar ungar, ljósgrænar plöntur eru fjarlægðar reglulega og settar með smitgát í ræktarker með nýjum miðli. Sá má út með hléum í allt að þrjú mánuði við kaldar aðstæður, eins og þær sem bent er á hér.

Nota skal efnafræðilega hrein (sýruþvegin) og dauðhreinsuð ræktunarker og smitgátaraðferðir. Ef stofnræktin mengast, t.d. af þörungum eða sveppum, er nauðsynlegt að gera ráðstafanir til að losna við hinar mengandi lífverur. Ef um er að ræða þörunga, og flestar aðrar mengandi lífverur, er það hægt með því að dauðhreinsa yfirborðið. Tekið er sýni af menguðu plöntunum og ræturnar skornar af. Plönturnar eru svo hristar kröftuglega í hreinu vatni og síðan dýft í 0,5% (rúmmálshlutfall) lausn af natríumhýpóklóríti í 30 sekúndur til allt að 5 mínútum. Plönturnar eru síðan skolaðar með dauðhreinsuðu vatni og fluttar, í nokkrum skömmtum, í ræktunarker með nýjum vaxtarmiðli. Við þessa meðferð deyr mikið af blöðunum, sérstaklega ef þau eru lengi í snertingu við váhrifin en sum þeirra sem lifa hana af eru yfirleitt laus við mengun. Þau má síðan nota til að endursá í nýjar ræktir.

4. viðbætur

Miðill

Mælt er með mismunandi vaxtarmiðlum fyrir *L. minor* og *L. gibba*. Mælt er með breyttri gerð sænska, staðlaða miðilsins fyrir *L. minor* en 20X AAP-miðli fyrir *L. gibba*. Samsetning beggja miðlanna er gefin upp hér á eftir. Við undirbúning þessa miðils skal nota íðefni af prófefna- eða greiningarhreinleika, auk afjónaðs vatns.

Sænskur, staðlaður vaxtarmiðill (SIS) fyrir *Lemna*

- Stofnlausnir I–V eru dauðhreinsaðar með gufusæfi (120 °C, 15 mínútur) eða með himnusíun (opstærð u.þ.b. 0,2 µm).
- Stofn VI (og VII, valkvætt) er aðeins dauðhreinsaður með himnusíun, ekki settur í gufusæfi.
- Geyma skal dauðhreinsaðar stofnlausnir á svölum og dimmum stað. Stofnum I–V skal henda eftir sex mánuði en stofnar VI (og VII, valkvætt) hafa eins mánaðar geymsluþol.

Nr. stofnlausnar	Efni	Styrkur í stofnlausn (g/l)	Styrkur í tilbúnum miðli (mg/l)	Tilbúinn miðill	
				Frumefni	Styrkur (mg/l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32, 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0, 2,4
II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4, 9,8
III	CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8, 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA 2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (jafnalausn)	490	490	—	—

Eftirfarandi er bætt í 900 ml af afjónuðu vatni til að útbúa einn lítra af SIS-miðli:

- 10 ml af stofnlausn I
- 5 ml af stofnlausn II
- 5 ml af stofnlausn III
- 5 ml af stofnlausn IV
- 1 ml af stofnlausn V
- 5 ml af stofnlausn VI
- 1 ml af stofnlausn VII (valkvætt)

Athugasemd: Fyrir tiltekin prófunariðefni getur þurft að nota stofnlausn VII (MOPS-jafnalausn) (sjá 11. lið).

pH-gildið er stillt að $6,5 \pm 0,2$ með annaðhvort 0,1 eða 1 móli af HCl eða NaOH og er fyllt að einum lítra með afjónuðu vatni.

20X-AAP-vaxtarmiðill

Stofnlausnir eru útbúar í dauðhreinsuðu, eimuðu eða afjónuðu vatni.

Geyma skal dauðhreinsaðar stofnlausnir á svölum og dimum stað. Við þær aðstæður hafa stofnlausnirnar a.m.k. 6–8 vikna geymsluþol.

Útbúar eru fimm stofnlausnir næringarefna (A1, A2, A3, B og C) fyrir 20X — AAP-miðil með íðefnum af prófefnahreinleika. Til að búa vaxtarmiðilinn til er 20 ml af hverri stofnlausn næringarefna bætt í u.þ.b. 850 ml af afjónuðu vatni. pH-gildið er stillt að $7,5 \pm 0,1$ með annaðhvort 0,1 eða 1 móli af HCl eða NaOH og er fyllt að einum lítra með afjónuðu vatni. Miðillinn er síðan síaður með (u.þ.b.) 0,2 μm himnusíu yfir í dauðhreinsað ílát.

Útbúa skal vaxtarmiðil, sem ætlaður er til prófunar, 1–2 dögum fyrir notkun svo sýrustigið verði stöðugt. Yfirfara skal sýrustig vaxtarmiðilsins fyrir notkun og stilla að nýju ef nauðsyn krefur með því að bæta við 0,1 eða 1 móli af NaOH eða HCl, eins og lýst er hér að framan.

Nr. stofnlausnar	Efni	Styrkur í stofnlausn (g/l)(*)	Styrkur í tilbúnum miðli (mg/l)(*)	Tilbúinn miðill	
				Frumefni	Styrkur (mg/l)(*)
A1	NaNO ₃	26	510	Na; N	190;84
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	4,4	90	Ca	24,04
A2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	290	S	38,22
A3	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ · O	1,4	30	K; P	9,4;3,7

Nr. stofnlausnar	Efni	Styrkur í stofnlausn (g/l)(*)	Styrkur í tilbúnum miðli (mg/l)(*)	Tilbúinn miðill	
				Frumefni	Styrkur (mg/l)(*)
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na; C	220, 43

(*) Nema annað sé tekið fram

Athugasemd: Fræðilega séð er æskilegur, endanlegur bikarbónatstyrkur (sá sem hefur í för með sér minnstu sýrustigsaðlögunina) 15 mg/L, ekki 300 mg/L. Hefðbundin notkun á 20X-AAP-miðli, þ.m.t. í hringprófuninni fyrir þessar leiðbeiningar, er þó byggð á 300 mg/L. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemma* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.)

STEINBERG-miðill (samkvæmt ISO 20079)

Styrkur og stofnlausnir

Breyttur Steinberg-miðill er eingöngu notaður í ISO 20079 fyrir *Lemma minor* (þar sem aðeins *Lemma minor* er leyfð í þeim staðli) en prófanir hafa leitt í ljós að einnig má fá góðar niðurstöður með honum fyrir *Lemma gibba*.

Nota skal íðefni af prófefna- eða greiningarhreinleika, auk afjónaðs vatns, þegar miðillinn er útbúinn.

Næringarmiðillinn er útbúinn úr stofnlausnum eða miðli í tíföldum styrk en það gefur hámarksstyrk miðilsins án útfellinga.

Tafla 1

Sýrustigsstöðgaður STEINBERG-miðill (breytt samkvæmt Altenburger)

Efnisþáttur		Næringarmiðill	
Nauðsynleg frumefni	mólmassi	mg/l	mmól/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41

Efnisþáttur		Næringarmiðill	
Snefilefni	mólmassi	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
EDTA dínatríumdíhydrat	372,24	1500,00	4,03

Tafla 2

Stofnlausnir (Nauðsynleg frumefni)

1. Nauðsynleg frumefni (í fimmtíuföldum styrk)	g/l
Stofnlausn nr. 1:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
Stofnlausn nr. 2:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
Stofnlausn nr. 3:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Tafla 3

Stofnlausnir (Snefilefni)

2. Snefilefni (í þúsundföldum styrk)	mg/l
Stofnlausn nr. 4:	
H ₃ BO ₃	120,0
Stofnlausn nr. 5:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Stofnlausn nr. 6:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0

2. Snefilefni (í þúsundföldum styrk)	mg/l
Stofnlausn nr. 7:	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
Stofnlausn nr. 8:	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
EDTA dínatríumdíhýdrat	1500,00

- Blanda má saman annars vegar stofnlausnum 2 og 3 og hinsvegar 4 til 7 (með tilliti til nauðsynlegra styrkleika).
- Til að auka geymsluþolið skulu stofnlausnirnar meðhöndlaðar í gufusæfi við 121 °C í 20 mínútur en einnig er hægt að dauðhreinsa þær með síun (0,2 µm). Eindregið er mælt með því að dauðhreinsa stofnlausn 8 með síun (0,2 µm).

Lokastyrkur (breytts) STEINBERG-miðils útbúinn

- 20 ml af stofnlausnum 1, 2 og 3 (sjá töflu 2) er bætt í u.þ.b. 900 ml af afjónuðu vatni til að forðast útfellingu.
- 1,0 ml af stofnlausnum 4, 5, 6, 7 og 8 er bætt í (sjá töflu 3).
- pH-gildið skal vera 5,5 +/- 0,2 (stillt með viðbót af minnsta mögulega magni af NaOH-lausn eða HCl).
- Fyllt er með vatni að 1000 ml.
- Ef stofnlausnirnar eru dauðhreinsaðar og notað er viðeigandi vatn er ekki þörf á frekari dauðhreinsun. Ef dauðhreinsunin er gerð á lokamiðlinum skal bæta stofnlausn 8 við eftir gufusæfinguna (við 121 °C í 20 mín).

Tífdalur styrkur (breytts) STEINBERG-miðils, útbúinn fyrir millistigsgeymslu

- 20 ml af stofnlausnum 1, 2 og 3 (sjá töflu 2) er bætt í u.þ.b. 30 ml af vatni til að forðast útfellingu.
- 1,0 ml af stofnlausnum 4, 5, 6, 7 og 8 er bætt í (sjá töflu 3). Fyllt er með vatni að 100 ml.
- Ef stofnlausnirnar eru dauðhreinsaðar og notað er viðeigandi vatn er ekki þörf á frekari dauðhreinsun. Ef dauðhreinsunin er gerð á lokamiðlinum skal bæta stofnlausn 8 við eftir gufusæfinguna (við 121 °C í 20 mín).
- pH-gildi miðilsins (lokastyrkur) skal vera 5,5 ± 0,2.

„6) Eftirfarandi kaflar C.31 til C.46 bætist við:

„C.31. PRÓFANIR Á LANDPLÖNTUM PRÓFANIR Á UPPKOMU UNGPLANTNA OG VEXTI ÞEIRRA

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 208 um prófanir (2006). Prófunaraðferðir eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda og gildis m.t.t. notkunar í samræmi við reglur. Þessi uppfærða prófunaraðferð er ætluð til að meta hugsanleg áhrif iðefna á uppkomu unglantna og vöxt þeirra. Sem slík tekur hún ekki til langvinnra áhrifa eða áhrifa á æxlun (t.d. fræmyndun (e. *seed set*), blómmyndun, þroskun aldina). Hafa skal í huga váhrifaskilyrði og eiginleika iðefnisins sem á að gera prófun á til að tryggja að viðeigandi prófunaraðferðir séu notaðar (t.d. skal hafa í huga áhrif sýrustigs og tengdra mótjóna við prófanir á málmum/málmsamböndum) (1. heimild). Þessi prófunaraðferð nær ekki yfir plöntur sem verða fyrir váhrifum af iðefnagufum. Prófunaraðferðin á við um prófanir á almennum iðefnum, sæfiefnum og plöntuvarnarefnum (einnig þekkt sem plöntuverndarvörur eða varnarefni). Hún var þróuð á grundvelli fyrirbyggjandi aðferða (2.–7. heimild). Aðrar viðmiðanir sem eiga við um prófanir á plöntum voru einnig hafðar í huga (8.–10. heimild). Skilgreiningar sem eru notaðar eru gefnar upp í 1. viðbæti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

2. Prófunin metur áhrif á uppkomu unglantna og byrjunarvöxt háplantna í kjölfar váhrifa frá prófunaríðefni í jarðvegi (eða öðrum hentugum jarðvegsefniði). Fræ eru látin komast í snertingu við jarðveg sem hefur verið meðhöndlaður með prófunaríðefninu og metin m.t.t. áhrifa í kjölfarið, yfirleitt 14 til 21 degi eftir að 50% unglantnanna í samburðarhópnum hafa komið upp. Mældir endapunktur eru sjónrænt mat á uppkomu unglantna, þurrvigst sprota (að öðrum kosti blautvigst sprota) og hæð sprota í tilteknum tilvikum sem og mat á sýnilegum skaðlegum áhrifum á mismunandi hluta plöntunnar. Þessar mælingar og athuganir eru bornar saman við mælingar og athuganir á ómeðhöndluðum samburðarplöntum.
3. Með hliðsjón af væntanlegri váhrifaleið er prófunaríðefninu annað hvort blandað í jarðveginn (eða hugsanlega í tilbúinn jarðvegsefniði) eða það borið á jarðvegssyfirborðið til að gefa rétta mynd af hugsanlegri váhrifaleið íðefnisins. Íblöndun í jarðveg er framkvæmd með því að meðhöndla jarðveg í lausu. Eftir íblöndunina er jarðvegurinn settur í potta og síðan er fræi af tiltekinni plöntutegund sáð í jarðveginn. Ef borið er á yfirborðsflöt jarðvegsins er það gert í pottunum eftir að búið er að sá fræinu. Prófunareiningunum (samurður og meðhöndlaður jarðvegur ásamt fræi) er síðan komið fyrir við viðeigandi aðstæður til að styðja spírun/vöxt plantna.
4. Hægt er að framkvæma prófunina til að ákvarða skammtasvörunarferil eða sem markprófun með einum styrkleika/skammti, allt eftir tilgangi rannsóknarinnar. Ef niðurstöður úr prófun með einum styrkleika/skammti fara yfir tiltekin eiturrhifagildi (t.d. ef í ljós koma áhrif sem fara yfir x%) er framkvæmd skammtastærðarrannsókn til að ákvarða efri og neðri mörk eiturrhifa og þar á eftir prófun með mismunandi styrkleikum/skömmtum til að búa til skammtasvörunarferil. Viðeigandi tölfræðigreining er notuð til að fá hrifstyrk EC_x eða það umfang notkunar sem veitir ER_x (t.d. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) fyrir viðkvæmstu breytuna, eða breytur, sem eru til athugunar. Einnig er hægt að reikna út styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) og minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) í þessari prófun.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

5. Eftirfarandi upplýsingar eru gagnlegar til að greina væntanlega váhrifaleið íðefnisins og við að hanna prófunina: byggingarformúla, hreinleiki, vatnsleysni, leysni í lífrænum leysum, gildin fyrir deilistuðul oktanóls og vatns, sog í jarðvegi, gufuþrýstingur, efnafræðilegur stöðugleiki í vatni og birtu og lífbrjótanleiki.

GILDI PRÓFUNARINNAR

6. Til að prófun teljist gild skulu samurðarhóparnir uppfylla eftirfarandi nothæfisviðmiðanir:
 - uppkoma unglantna er a. m. k. 70%,
 - sýnileg eiturrhif er ekki að sjá á unglöntunum (t.d. fólvasýki, drep, visnun, afmynduð lauf og stilkur) og sýnilegur breytileiki í vexti, formi og byggingu plantnanna er eðlilegur að því er varðar þá tilteknu tegund,
 - meðallifun uppkominnar samurðarungplantna er a.m.k. 90% meðan rannsóknin stendur yfir,
 - umhverfisádstæður tiltekinna tegunda eru nákvæmlega eins og ræktunarefni innihalda sama magn af jarðvegsefniði, burðarefni eða undirlagi frá sömu uppsprettu.

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

7. Hægt er að gera prófanir á viðmiðunariðefni með reglulegu millibili til að sannreyna að nothæfi prófunarinnar og svörum tiltekinna prófunarplantna og prófunarskýrði hafi ekki tekið umtalsverðum breytingum með tímanum. Að öðrum kosti er hægt að nota rannsóknarsögulegar mælingar á lífmassa eða vexti samurðarhópa til að meta nothæfi prófunarkerfis í tilteknum rannsóknarstofum og nota þær sem ráðstöfun til innra gæðaeftirlits rannsóknarstofunnar.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Náttúrulegur jarðvegur — tilbúið undirlag

8. Hægt er að rækta plöntur í pottum og nota sendna mold, myldinn sand eða sendna leirmold sem inniheldur allt að 1,5% lífrænt kolefni (u.þ.b. 3% lífrænt efni). Einnig má nota pottamold, sem hægt er að kaupa, eða tilbúna jarðvegsblöndu sem inniheldur allt að 1,5% lífrænt kolefni. Ekki skal nota leirjarðveg ef vitað er að prófunaríðefnið er mjög leirsækið. Sigta skal jarðveg af akri niður í agnastærðina 2 mm til að gera hann einsleitun og fjarlægja grófar agnir. Greina skal frá tegund og kornastærð, hlutfalli lífræns kolefnis í %, sýrustigi og saltinnihaldi sem og rafleiðni í endanlegum tilreiddum jarðvegi. Jarðvegurinn skal flokkaður samkvæmt stöðluðu flokkunarkerfi (11. heimild). Hægt er að gerilsneyða jarðveginn eða hitameðhöndla til að draga úr áhrifum sjúkdómsvalda í honum.
9. Náttúrulegur jarðvegur getur gert túlkun niðurstaðna flóknari og aukið breytileika vegna breytilegra eðlisefnafræðilega eiginleika og örverusamfélaga. Þessar breytur breyta síðan rakaheldnigetun, efnabindingargetu, loftun og næringarefna- og snefilefnainnihaldi. Til viðbótar við breytileikann í þessum eðlisrænu þáttum verður einnig breytileiki í efnafræðilegum eiginleikum, s.s. sýrustigi og möguleika á afoxun/oxun sem getur haft áhrif á lífaðgengi prófunaríðfnisins (12.–14. heimild).
10. Yfirleitt er ekki notað tilbúið undirlag til prófunar á plöntuverndarvörum en það getur komið að notum við prófanir á almennum íðefnum eða ef æskilegt er að lágmarka breytileika náttúrulegs jarðvegs og auka samburðarhæfi prófunarniðurstaðnanna. Undirlag, sem er notað, skal samsett úr hvarftregum efnum sem lágmarkar vixlverkun við prófunaríðefnið, leysinn sem er burðarefni eða hvort tveggja. Komið hefur í ljós að sýrupveginn kvarssandur, steinull og glerkúlur (t.d. 0,35 til 0,85 mm í þvermál) eru hentug hvarftreg efni, sem draga afar lítið af prófunaríðefni í sig (15. heimild), sem tryggir að unglönturnar geta tekið upp mesta mögulega magn íðfnisins gegnum ræturnar. Óheppilegt undirlag er m.a. vermikúlít, perlusteinn eða önnur mjög íseyg efni. Gefa skal næringarefni fyrir vöxt plantna til að tryggja að plönturnar séu ekki undir álagi vegna næringarefnaskorts og ef unnt er skal meta þetta með efnagreiningu eða sjónrænu mati á samburðarplöntum.

Viðmiðanir fyrir vali á prófunartegund

11. Tegundirnar sem valdar eru skulu spanna nokkuð vítt svið, þ.e. hafa skal í huga flokkunarfræðilega fjölbreytni þeirra í jurtaikinun, dreifingu, þéttleika, lífsferliseiginleika sem eru sértækir fyrir tegundina og svæði þar sem þær koma fyrir frá náttúrunnar hendi, til að kalla fram svörun á fjölbreyttu sviði (8., 10. og 16.–20. heimild). Hafa skal eftirfarandi eiginleika í huga við val á hugsanlegum prófunartegundum:
 - tegundirnar eru með eins fræ, sem er greiðlega aðgengilegt frá áreiðanlegri, staðlaðri fræuppsprettu eða -uppsprettum og veitir samræmda, áreiðanlega og jafna spírur, sem og sams konar unglöntuvöxt,
 - plantan er hentug til prófana á rannsóknarstofu og gefur áreiðanlegar og samburðarnákvæmar niðurstöður innan prófunarstöðva og á milli þeirra,
 - næmleiki tegundanna sem eru prófaðar er skal vera í samræmi við svörun plantna sem er að finna í umhverfinu sem varð fyrir váhrifum af íðefninu,
 - þær hafa verið notaðar að einhverju leyti í fyrri eiturrhifaprófunum og notkun þeirra, t.d. í lífgreiningar vegna illgresiseyða, skimun fyrir þungmálmum, álagsprófanir m.t.t. seltu eða steinefna eða rannsóknir á návörn (e. *allelopathy*), bendir til næmleika gagnvart margs konar streituvöldum,
 - þær eru samrýmanlegar við vaxtarskilyrði prófunaraðferðarinnar,
 - þær uppfylla gildisviðmiðanir prófunarinnar.

Nokkrar af þeim prófunartegundum sem rannsóknarsögulega séð hafa verið mest notaðar eru skráðar í 2. viðbæti og hugsanlegar tegundir, sem ekki eru nytjaplöntur, í 3. viðbæti.

- Fjöldi tegunda sem á að prófa er háður viðeigandi kröfum samkvæmt reglum og er því ekki tilgreindur í þessari prófunaraðferð.

Notkun prófunariðefnis

- Setja skal íðefnið í viðeigandi burðarefni (t.d. vatn, asetón, etanól, pólýetýlenglýkól, arabískt gúmmí, sand). Einnig er hægt að prófa blöndur (samsetta vöru eða samsetningar) sem innihalda virk innihaldsefni og ýmis hjálparefni.

Íblöndun í jarðveg/tilbúð undirlag

- Hægt er að bæta íðefnum sem eru vatnsleysanleg, eða er blandað í vatn, við vatn og síðan er lausninni blandað út í jarðveginn með viðeigandi blöndunarbúnaði. Þessi tegund prófunar getur átt við ef váhrif frá íðefninu verða gegnum jarðveg eða gropuvatn í jarðvegi og ef talin er hætta á upptöku gegnum ræturnar. Viðbót prófunariðefnisins skal ekki vera fram yfir vatnsheldni jarðvegsins. Rúmmál viðbættis vatns skal vera það sama fyrir alla prófunarstyrki en skal takmarkað við að ekki myndist jarðvegsklumpar.
- Íðefni sem hafa litla vatnsleysni skulu leyst upp í heppilegum rokgjörnum leysi (t.d. asetóni, etanóli) og blönduð með sandi. Síðan er hægt að fjarlægja leysinn úr sandinum með loftstraumi meðan stöðugt er hrært í sandinum. Meðhöndluðum sandi er blandað saman við tilraunajarðveginn. Annar skammtur, einungis með sandi og leysi, er tilreiddur til samanburðar. Jafnmiklu magni af sandi, sem búð er að blanda leysi í og fjarlægja, er bætt við öll meðhöndlunarstig og við samanburðarskammtinn. Að því er varðar föst, óleysanleg íðefni er þurrum jarðvegi og íðefninu blandað saman í hentugum blöndunarbúnaði. Því næst er moldinni bætt í pottana og fræinu sáð strax.
- Ef notað er tilbúð undirlag í stað jarðvegs er hægt að leysa íðefni, sem eru leysanleg í vatni, upp í næringarlausninni rétt áður en prófunin hefst. Íðefnum, sem eru óleysanleg í vatni en er hægt að blanda í vatn með því að nota leysi sem burðarefni, skal bætt við næringarlausnina ásamt burðarefninu. Ef ekki er til óeitrað, vatnsleysanlegt burðarefni fyrir vatnsóleysanlegt íðefni skal leysa það upp í viðeigandi rokgjörnum leysi. Lausnin er blönduð með sandi eða glerkúlum, sett í hverfisvala og látin gufa upp þannig að eftir verður jafnt lag af íðefni á sandi eða kúlum. Veginn skammtur af kúlum skal settur í útdrátt með sama lífræna leysinum og íðefnið greint áður en pottarnir eru fylltir.

Borið á yfirborð

- Að því er varðar plöntuverndarvörur er prófunariðefnið oft borið á með því að úða prófunarlausninni á yfirborð jarðvegsins. Hönnun og afkastageta alls búnaðar sem er notaður við framkvæmd prófunarinnar, þ.m.t. búnaður sem er notaður til að tilreiða prófunariðefnið og bera það á, skal vera þannig að hægt sé að framkvæma allar prófanir, sem búnaðurinn er notaður við, á nákvæman hátt og þær séu samanburðarnákvæmar að því er varðar þekju. Þekjan skal vera jöfn á öllu jarðvegsyfirborðinu. Sýna skal aðgát til að komast hjá því að íðefni geti ásogast eða hvarfast við búnaðinn (t.d. plastslöngur og fitusækin íðefni eða stálhluta og -hluti). Prófunariðefninu er údað þannig á yfirborð jarðvegsins að líkt er eftir því þegar borið er á með úðunartanki á dæmigerðan hátt. Almenn séð skal úðunarmagnið vera á því bili sem notað er við viðtekna jarðræktaraðferð og greina skal frá magninu (vatnsmagni o.s.frv.). Velja skal stút af tegund sem gefur jafna þekju á jarðvegsyfirborðinu. Ef leysar og burðarefni eru notuð skal setja upp annan hóp með samanburðarplöntum sem fá einungis leysinn/burðarefnið. Þetta er ekki nauðsynlegt vegna plöntuverndarvara sem eru prófaðar í samsetningum.

Sannprófun á styrk/skammti prófunariðefnis

- Staðfesta skal styrk/skammta, sem eru notaðir, með viðeigandi greiningu til sannprófunar. Að því er varðar leysanleg íðefni er hægt að staðfesta sannprófun á öllum prófunarstyrk/-skömmtum með greiningu á prófunarlausninni með mesta styrkinn sem notuð er í prófuninni og með því að halda skrá um seinni þýnningu og notkun á kvörðuðum notkunarbúnaði (t.d. kvarðaðri glervöru til greininga, kvörðun á údadælubúnaði). Að því er varðar óleysanleg íðefni verður að leggja fram sannprófun á efnasamböndum með því að veita prófunariðefnið sem sett er í jarðveginn. Ef þess er krafist að sýnt sé fram á einsleitni getur greining á jarðveginum reynst nauðsynleg.

AÐFERÐ

Tilhögun prófunar

19. Fræjum sömu tegundar er sáð í potta. Fjöldi fræja sem er sáð í hvern pott fer eftir tegund, stærð potts og tímalengd prófunar. Fjöldi plantna í potti skal miðast við að skilyrði til vaxtar séu fullnægjandi og þrengsli verði ekki of mikil meðan prófunin stendur yfir. Hámarksþéttleiki plantna er á bilinu 3–10 fræ á hverja 100 cm², allt eftir stærð fræjanna. Til dæmis er mælt með einni til tveimur maís-, sojabaua-, tómat-, agúrku- eða sykurrófuþlöntum á hvert 15 cm ílát; þremur repju- eða garðertuplöntum á hvert 15 cm ílát og 5–10 lauk- eða hveitiplöntum eða öðrum litlum fræjum á hvert 15 cm ílát. Fjöldi fræpotta og samhliða prófana (samhliða prófun er skilgreind sem pottur, af þeim sökum teljast plöntur í sama potti ekki samhliða prófun) skal nægja til ákjósanlegrar tölfræðilegrar greiningar (21. heimild). Hafa skal í huga að breytileiki verður meiri hjá prófunartegundum þar sem færri, stór fræ eru notuð í hvern pott (samhliða prófun) samanborið við prófunartegundir þar sem unnt er að nota fleiri lítil fræ í hvern pott. Hægt er að lágmarka þennan breytileika með því að sá sama fjölda fræja í hvern pott.
20. Samanburðarhópar eru notaðir til að tryggja að áhrif sem koma í ljós tengist einungis eða séu einungis rekjanleg til váhrifa af prófunariðefninu. Hentugur samanburðarhópur skal að öllu leyti vera nákvæmlega eins og prófunarhópur að frátöldum váhrifum af prófunariðefninu. Allar plöntur sem eru prófaðar í tiltekinni prófun, þ.m.t. samanburðarhópur, skulu vera af sama uppruna. Til að koma í veg fyrir bjögur er gerð krafa um slembiúthlutun prófunar- og samanburðarpotta.
21. Forðast skal fræ sem eru þakin skordýraeitri eða sveppaeyði (þ.e. meðhöndlað fræ). Þó leyfa sum eftirlitsyfirvöld notkun á tilteknum ókerfisvirkum, snertivirkum sveppaeyðum (e. *contact fungicide*) (t.d. kaptani, þírami) (22. heimild). Ef fræbornir sýklar (e. *seed-borne pathogen*) eru áhyggjuefni er hægt að leggja fræið í bleyti í stutta stund í veika 5% hýpóklórítlausn, hreinsa þau síðan vandlega undir rennandi vatni og þerra. Ekki er leyfð meðhöndlun til úrbóta með öðrum plöntuverndarvörum.

Prófunarskilyrði

22. Prófunarskilyrði skulu vera í samræmi við þau skilyrði sem eru nauðsynleg fyrir eðlilegan vöxt tegundanna og yrkjanna sem eru prófuð (í 4. viðbæti er að finna dæmi um prófunarskilyrði). Plönturnar sem eru að koma upp skulu geymdar samkvæmt góðum starfsvenjum í garðyrkju í klefum með stýrðu umhverfi, lokuðum rannsóknagróðurhúsum (e. *phyotron*) eða gróðurhúsum. Þegar notaðar eru vaxtaraðstöður fela slíka starfsvenjur yfirleitt í sér eftirlit og hæfilega tíða skráningu (t.d. daglega) á hitastigi, raka, styrk koltvísýrings, birtu (styrkur, bylgjulengd, virk bylgjulengd ljóstillifunar) og birtutímabili, aðferð við vökvun o.s.frv., til að tryggja góðan plöntuvöxt en hann er metinn út frá samanburðarplöntum völdu tegundanna. Stjórna skal hitastigi gróðurhúss með loftunar-, hitunar- og/ eða kælikerfum. Almenn er mælt með eftirfarandi skilyrðum vegna prófana í gróðurhúsum:

— hitastig: 22 °C ± 10 °C,

— raki: 70% ± 25%,

— ljóslota: a.m.k. 16 klst. birta,

— ljósstyrkur: 350 ± 50 µE/m²/s. Viðbótarlýsing kann að reynast nauðsynleg ef styrkurinn fer undir 200 µE/m²/s, bylgjulengd 400–700 nm, nema fyrir vissar tegundir sem hafa minni þörf fyrir birtu.

Vakta skal umhverfisaðstöður meðan á rannsókninni stendur og greina frá þeim. Rækta skal plönturnar í ógropnum plastpottum eða gljábrenndum pottum með bakka eða diskir undir. Færa má pottana til með reglulegu millibili til að lágmarka breytileika í vexti plantnanna (vegna mismunandi prófunarskilyrða í vaxtaraðstöðunni). Pottarnir verða að vera það stórir að vöxtur geti verið eðlilegur.

23. Bæta má jarðvegsnæringarefnum við eftir þörfum til að viðhalda góðum plöntuþrótti. Hægt er að meta þörf fyrir viðbótarnæringarefni, og tímasetningu vegna þeirra, með því að fylgjast með samanburðarplöntunum. Mælt er með því að botnvökva í prófunarilátin (t.d. með því að nota glertrefjaþráð). Þó er hægt að nota vökvun ofan frá í upphafi til að örva fræspírun og greiða fyrir því að iðefnið fari niður í jarðveginn ef það er borið á yfirborðið.

24. Sérstöku vaxtarskilyrðin skulu henta tegundinni sem er prófuð og prófunariðefninu sem verið er að rannsaka. Hafa skal samanburðarplöntur og meðhöndlaðar plöntur við sömu umhverfisaðstæður en þó skal grípa til viðeigandi ráðstafana til að koma í veg fyrir víxlváhrif (t.d. frá rokgyörnum íðefnum) milli mismunandi meðhöndlunar og frá prófunariðefninu á samanburðarhópin.

Prófun með einum styrkleika/skammti

25. Taka verður tillit til ýmissa þátta við ákvörðun á viðeigandi styrkleika/skammti íðefnis þegar framkvæmd er prófun með einum styrkleika eða skammti (ögrunarprófun/markprófun). Að því er varðar almenn íðefni eru það m.a. eðlisefnafræðilegir eiginleikar íðefnisins. Að því er varðar plöntuverndarvörur verður að taka tillit til eðlisefnafræðilegra eiginleika og notkunarmynsturs prófunariðefnisins, hámarksstyrks þess eða umfangs notkunar, hversu oft það er notað á hverri árstíð og/eða þrávirgni þess. Til að ákvarða hvort almennt íðefni hefur þá eiginleika að vera eitrad fyrir plöntur getur verið við hæfi að gera prófun með hámarksstyrk, 1000 mg/kg af þurrum jarðvegi.

Skammtastærðarrannsókn

26. Þegar nauðsyn krefur er hægt að framkvæma skammtastærðarrannsókn til að veita leiðbeiningar um styrkleika/skammta sem skal prófa í endanlegri skammtasvörunarrannsókn. Að því er varðar skammtastærðarrannsóknina skal hafa löng bil milli prófunarstyrks/-skammta (t.d. 0,1, 1,0, 10, 100 og 1000 mg/kg þurr jarðvegur). Að því er varðar plöntuverndarvörur gæti styrkleiki/skammtar byggst á ráðlögðum styrk eða hámarksstyrk eða umfangi notkunar, t.d. 1/100, 1/10, 1/1 af ráðlögðum styrk/hámarksstyrk eða umfangi notkunar.

Prófun með mismunandi styrkleikum/skömmtum

27. Tilgangurinn með prófun með mismunandi styrkleikum/skömmtum er að fastsetja tengsl milli skammts og svörunar og ákvarða EC_x - eða ER_x -gildi fyrir uppkomu, lífmassa og/eða sjónræn áhrif samanborið við váhrifalausán samanburðarhóp eins og eftirlitsyfirvöld gera kröfu um.
28. Fjöldi og styrkbil eða skammtabil skulu nægja til að það fái áreiðanleg tengsl milli skammts og svörunar, aðhvarfsjafna og áætlun á EC_x - eða ER_x . Valinn styrkur/skammtar skal ná yfir EC_x - eða ER_x -gildi sem á að ákvarða. Ef gerð er t.d. krafa um EC_{50} -gildi væri æskilegt að gera prófanir með skömmtum sem hafa áhrif við 20 til 80%. Ráðlagður fjöldi prófunarstyrks/-skammta til að ná þessu fram er a.m.k. fimm í jafnhlutfallaröð að viðbættum ómeðhöndluðum samanburðarhóp með styrkmun sem er ekki meiri en þrjú. Að því er varðar hvern meðhöndlaðan hóp og samanburðarhóp skulu samhliða prófanir vera a.m.k. fjórar og heildarfjöldi fræja skal vera a.m.k. 20. Ef til vill er þörf á fleiri samhliða prófunum á tilteknum plöntum með lágt spirunarhlutfall eða breytilegan vaxtarhátt til að auka tölfræðilegan styrk prófunarinnar. Ef fleiri prófunarstyrkleikar/-skammtar eru notaðir má fækka samhliða prófunum. Ef meta á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif getur verið þörf á fleiri samhliða prófunum til að fá fram tilætlaðan tölfræðilegan styrk (23. heimild).

Athuganir

29. Meðan á eftirlitstímabilinu stendur, þ.e. 14 til 21 degi eftir að 50% af samanburðarplöntum (einnig samanburðarhópur með leysi, ef við á) hafa komið upp, eru athuganir á plöntunum framkvæmdar oft (a.m.k. vikulega, daglega, ef unnt er) m.t.t. uppkomu, sýnilegra eitruáhrifa og dánartíðni. Við lok prófunarinnar skal skrá mælingar á hundraðshlutfalli uppkomu og lífmassa lífandi plantna sem og sýnileg skaðleg áhrif á mismunandi hluta plöntunnar. Undir það síðastnefnda falla afbrigðileiki í útliti uppkominnar unglantna, kyrkingslegur vöxtur, fólvasýki, óeðlilegur litur, dánartíðni og áhrif á plöntuþroska. Hægt er að mæla endanlegan lífmassa með því að nota endanlega meðalþurrvigst sprota þeirra plantna sem lifa með því að skera sprotana af við yfirborð jarðvegsins og þurrka þá í stöðuga þyngd við 60 °C. Að öðrum kosti er hægt að mæla endanlegan lífmassa með því að nota votþyngd sprota. Hæð sprotans getur verið annar endapunktur ef eftirlitsyfirvöld gera kröfu um það. Nota skal sams konar stigakerfi yfir sýnilega áverka til að meta sýnilega eitrefnasvörun. Dæmi um framkvæmd megindlegs og eigindlegs sjónræns mats er að finna í heimildum (23.–24. heimild).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Tölfræðileg greining*Prófun með einum styrkleika/skammti*

30. Greina skal gögn fyrir hverja plöntutegund með viðeigandi tölfræðiaðferð (21. heimild). Gera skal grein fyrir umfangi áhrifa við prófunarstyrk/-skammt eða ef tiltekin áhrif af prófunarstyrk/-skammti nást ekki (t.d. < merkjanleg áhrif $x\%$ við styrk eða skammt y)

Prófun með mismunandi styrkleikum/skömmtum

31. Tengsl milli skammts og svörunar eru fastsett með aðhvarfsjöfnu. Hægt er að nota mismunandi líkön: t.d. gætu aðferðirnar logit, probit, Weibull, Spearman-Kärber, klippt Spearman-Kärber o.s.frv., verið við hæfi til að áætla EC_x eða ER_x (t.d. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) og öryggismörk m.t.t. uppkomu sem skammtabundin gögn. Að því er varðar vöxt unglantna (þyngd og hæð) sem samfellda endapunkta er hægt að áætla EC_x eða ER_x og öryggismörk þeirra með því að nota viðeigandi aðhvarfsgreiningu (t.d. Bruce-Versteeg ólínulega aðhvarfsgreiningu (25. heimild)). Þar sem unnt er skal R^2 vera 0,7 eða hærra fyrir viðkvæmustu tegundina og prófunarstyrkur/-skammtar sem eru notaðir ná yfir 20% til 80% áhrif. Ef meta á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif skal notkun á öflugum tölfræðilegum prófunum vera ákjósanlegust og þær skulu valdar á grundvelli gagnadreifingar (21.–26. heimild).

Prófunarskýrsla

32. Í prófunarskýrslu skal setja fram niðurstöður rannsókna sem og nákvæma lýsingu á prófunarskilyrðum, ítarlega umfjöllun um niðurstöður, greiningu á gögnunum og ályktanir sem dregnar eru af greiningunni. Leggja skal fram samantekt í töflu og útdrátt úr niðurstöðum. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í skýrslunni:

Prófunariðefni:

- efnafræðileg sanngreiningargögn, viðkomandi eiginleikar íðefnisins sem er prófað (t.d. log P_{ow} , vatnsleysni, gufuþrýstingur og upplýsingar um umhverfisafdrif og -hegðun, ef þær liggja fyrir),
- upplýsingar um tilreiðslu prófunarlausnarrinnar og staðfesting á prófunarstyrk eins og tilgreint er í 18. lið.

Prófunartegund:

- upplýsingar um prófunarlífveruna: tegund/yrki, plöntuættir, vísindaheiti og almennt heiti, uppruni og saga fræsins, lýst eins ítarlega og hægt er (þ.e. heiti birgis, hundraðshlutfall spirunar, stærðarflokkur fræs, númer lotu eða framleiðslulotu, fræar eða vaxtartímabil þegar því er safnað, dagsetning mats á spírun), lífvænleiki o.s.frv.,
- fjöldi tegunda ein- og tvíkímblöðunga sem er prófaður,
- rök fyrir vali á tegund,
- lýsing á geymslu, meðhöndlun og viðhaldi fræs.

Prófunarskilyrði:

- prófunarstöð (t.d. ræktunarkassi, lokað rannsóknargróðurhús og gróðurhús),
- lýsing á prófunarkerfi (t.d. mál potts, efni í potti og magn jarðvegs),
- eiginleikar jarðvegs (kornastærð eða tegund jarðvegs: dreifing og flokkun jarðvegsagna, eðlis- og efnafræðilegir eiginleikar þ.m.t. lífrænt efni í %, lífrænt kolefni í % og sýrustig),
- tilreiðsla jarðvegs/undirlags (t.d. jarðvegur, tilbúinn jarðvegur, sandur og annað) fyrir prófunina,
- lýsing á næringaræti, ef það er notað,

- notkun prófunariðefnisins: lýsing á notkunaraðferð, lýsing á búnaði, váhrifaskammtar og magn, þ.m.t. efnafraeðileg sannprófun, lýsing á kvörðunaraðferð og lýsing á umhverfisaðstæðum meðan á notkun stendur,
- vaxtarskilyrði: ljósstyrkur (t.d. virk bylgjulengd ljóstillifunar) ljóslota, hámarks-/lágmarkshitastig, áætlun um vökvun og aðferð, frjövgun,
- fjöldi fræja í hverjum potti, fjöldi plantna á hvern skammt, fjöldi samhliða prófana (pottar) fyrir hvern váhrifaskammt,
- tegund og fjöldi samanburðarsýna (neikvæð og/eða jákvæð samanburðarsýni, samanburður með leysi ef hann eru notaður),
- tímalengd prófunar.

Niðurstöður:

- tafla yfir alla endapunkta fyrir hverja samhliða prófun, prófunarstyrk/-skammt og tegund,
- uppkomnar plöntur sem fjöldi og hundraðshlutfall samanborið við samanburðarhóp,
- mælingar á lífmassa (þurrvigt eða blautvigt sprota) plantnanna sem hundraðshlutfall af samanburðarhópi,
- hæð plöntusprota sem hundraðshlutfall af samanburðinum, ef hún er mæld,
- hundraðshlutfall sýnilegra áverka og eigindleg og megindleg lýsing á sýnilegum áverkum (fölvásýki, drep, visnun, afmynduð lauf og stilkur sem og hvers kyns skortur á áhrifum) af völdum prófunariðefnisins, samanborið við samanburðarplöntur,
- lýsing á matskvarðanum sem er notaður til að dæma um sýnilega áverka, ef sjónrænt mat er lagt fram,
- greina skal frá hundraðshlutfalli áverka vegna rannsókna með einum skammti,
- EC_x- eða ER_x-gildi (t.d. EC₅₀, ER₅₀, EC₂₅, ER₂₅) og tengd öryggismörk. Þegar aðhvarfsgreining er framkvæmd skal tilgreina staðalskekkju fyrir aðhvarfsjöfnuna og staðalskekkju fyrir mat á einstökum breytum (t.d. hallatala, skurðpunktur),
- gildi styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif og minnsta styrks sem hefur merkjanleg áhrif, ef þau eru reiknað út,
- lýsing á tölfræðiaðferðum og forsendum sem eru notuð,
- myndræn útfærsla á þessum gögnum og tengslum milli skammts og svörunar hjá tegundinni sem er prófuð.

Frávik frá þeim verkferlum sem lýst er í þessari prófunaraðferð og öll óvenjuleg tilvik meðan á prófuninni stendur.

HEIMILDIR

- 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) Kaffli C.33 í þessum viðauka. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).
-

*I. viðbætur***Skilgreiningar**

Virkt innihaldsefni (eða virkt efni) er efni sem er hannað til að valda sértækum, líffræðilegum áhrifum (t.d. varnir gegn skordýrum, varnir gegn plöntusjúkdómum, illgresiseyðing á meðhöndlunarsvæðinu), einnig þekkt sem virkt innihaldsefni/virkt efni af tæknilegum hreinleika.

Íðefni er efni eða blanda.

Plöntuverndarvörur eða varnarefni eru efni með sértæka lífvirkni sem eru notuð af ásetningi til að verja nytjaplöntur fyrir skaðvöldum (t.d. sveppasjúkdómum, skordýrum og samkeppnisplöntum).

EC_x-styrkur sem hefur x% áhrif eða ER_x, x% miðgildisáhrifahlutfall er styrkur eða skammtur sem leiðir til óæskilegra breytinga eða frávíka hjá x% í þeim endapunkti prófunarinnar sem er mældur samanborið við samanburðarhópinn (t.d. myndi 25% eða 50% skerðing á uppkomu unglantna, þyngd sprota, endanlegum fjölda plantna sem eru til staðar eða fjölgun á sýnilegum áverkum gefa EC₂₅/ER₂₅ eða EC₅₀/ER₅₀ eftir því sem við á).

Uppkoma er þegar kímstöngull eða kímblað kemur upp úr jarðveginum.

Samsetning er samsett verslunarvara sem inniheldur virka efnið (virkt innihaldsefni), einnig þekkt sem endanleg efnablanda ⁽⁶⁾ eða dæmigerð vara til endanlegrar notkunar.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) er minnsti styrkur prófunaríðefnisins þar sem vart var við áhrif. Í þessari prófun hefur styrkur, sem svarar til minnsta styrks sem hefur merkjanleg áhrif, tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) á tilteknu váhrifatímabili, samanborið við samanburðarsýni, og er hærri en gildi styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif.

Plöntur utan markhóps: Plöntur sem eru utan markhópssvæðisins. Þegar um er að ræða plöntuverndarvörur á þetta yfirleitt við um plöntur utan meðhöndlunarsvæðisins.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) er mesti styrkur prófunaríðefnisins þar sem engin áhrif koma fram. Í þessari prófun hefur styrkur, sem svarar til styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif, engin tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) á tilteknu váhrifatímabili, samanborið við samanburðarsýni.

Eitrun fyrir plöntur: Skaðleg frávik (samkvæmt mælingum og sjónrænu mati) frá eðlilegu útliti og vexti plantna vegna viðbragða við tilteknu íðefni.

Samhliða prófun er tilraunaeyning sem er samanburðarhópur og/eða meðferðarhópur. Í þessum rannsóknum er potturinn skilgreindur sem samhliða prófunin.

Sjónrænt mat: Mat á sýnilegum skemmdum á grundvelli athugana á stöðu plöntunnar, þrótti, vansköpun, fólvasýki, drepi og útliti hennar í heild sinni, samanborið við samanburðarsýni.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

⁽⁶⁾ Endanleg efnablanda: Samsett vara, sem inniheldur virka íðefnið (virkt innihaldsefni), sem er seld í verslunum.

2. viðbætur

Skrá yfir tegundir sem rannsóknarsögulega séð hafa verið notaðar í prófanir á plöntum

Ætt	Tegund	Almenn heiti
<i>DICOTYLEDONAE</i>		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Gulrætur
Asteraceae (Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Sólblóm
Asteraceae (Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Salat
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Hvítur mustarður
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Kínakál
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Oliurepja
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Hvítkál
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Næpa
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Karsi
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Hreðka
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Sykkurrófa
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Gúrka
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max</i> (<i>G. soja</i>)	Sojabaun
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Mungbaun
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Buskabaun, garðbaun
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Garðerta
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Grikkjasmári
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Akurmaríuskór
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Rauðsmári
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Fóðurflækja
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Lín
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Bókhveiti
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicon</i>	Tómatur

Ætt	Tegund	Almenn heiti
<i>MONOCOTYLEDONAE</i>		
Liliaceae (Amaryllidaceae)	<i>Allium cepa</i>	Laukur
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Hafrar
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Bygg
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Vallarrýgresi
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Hrisgrjón
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Rúgur
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Dúrri, akurdúrri
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Hveiti
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Maís

3. viðbætur

Skrá yfir hugsanlegar tegundir sem ekki eru nýttjaplöntur

Efnahags- og framfarastofnunin – tegundir sem hugsanlega má nota við eiturrhifaprófanir á plöntum

Athugasemd: Í eftirfarandi töflu eru upplýsingar um 52 tegundir sem ekki eru nýttjaplöntur (heimildir eru gefnar í sviga fyrir hverja færslu). Uppgefnin uppkomuhlutföll eru úr birtum skrifum og er einungis til almenna leiðbeininga. Reynsla af hverri um sig getur verið breytileg, háð fræuppsprettu og öðrum þáttum.

ÆTT Tegund Grasafræðiheiti (Íslenskt heiti)	Líftími ⁽¹⁾ og búsvæði	Fræþyngd (mg)	Ljóslofa fyrir spírun eða vöxt (²)	Sáningardýpt (mm) (³)	Spírunartími (dagar) (⁴)	Sérstök meðferð (⁵)	Eiturrhifaprófun (⁶)	Fræbingjar (⁷)	Aðrar heimildir (⁸)
APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (runnakerfill)	E, T röskuð svæði, limgerði, beittlönd (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	B = M (14)	0 (1, 19)	5 (50%) (19)	kuldameðferð (7, 14, 18, 19) þroskun getur verið naudsýnleg (19) myrktur hindrar spírun (1, 19) engin sérstök meðferð (5)	EFTIR (5)		
ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (fagurfríll)	F graslendi, ræktanleg svæði, svörtur (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	B = M (14)	0 (4)	3 (50%) (19) 11 (100%) (18)	ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírun (18, 19) engin sérstök meðferð (4, 14)	EFTIR (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (garðakornblóm)	E akrar, vegarkantar, opin búsvæði (16)	4,1–4,9 (4, 14)	B = M (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100%) (14)	engin sérstök meðferð (2, 4)	EFTIR (2,4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (surtarkornblóm)	F akrar, vegarkantar, opin búsvæði (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	B = M (14)	0 (19)	3 (50%) (19) 4 (97%) (18)	þroskun getur verið naudsýnleg (18, 19) myrktur hindrar spírun (19) engin sérstök meðferð (5, 14, 26)	EFTIR (5, 22, 26)	A	
<i>Inula helenium</i> (iðunnarsunna)	F rök, röskuð svæði (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		engin sérstök meðferð (4)	EFTIR (4)	A, F	

ÆTT Tegund Grasafræðiheiti (Íslenskt heiti)	Líftími (1) og búsvæði	Fræþyngd (mg)	Ljóslofa fyrir spirun eða vöxt (2)	Sáingardýpt (mm) (3)	Spirunartími (dagar) (4)	Sérstök meðferð (5)	Eitunhrifaþróun (6)	Fræþingjar (7)	Aðrar heimildir (8)
<i>Leontodon hispidus</i> (burstaflíll)	F akrar, vegarkantar, róskuð svæði (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	B = M (14)	0 (19)	4 (50%) (19) 7 (80%) (18)	myrkur hindrar spirun (17, 18, 19) engin sérstök meðferð (5, 23)	EFTIR (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (stráhattur)	T, F róskuð (16)	0,3 (4, 14)	B = M (14)	0 (4, 33)	< 10 (100%) (33)	engin sérstök meðferð (4, 14, 33)	EFTIR (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> (kanadagullhris)	F beitiland, opin svæði (16)	0,06–0,08 (4, 14)	B = M (11)	0 (4)	14–21 (11)	blandað með jafnstórum hluta af sandi og látið liggja í bleyti í 500 míljónarhlutum af GA í 24 klst. (11) engin sérstök meðferð (4)	EFTIR (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i> (kræklujurt)	E akrar, opin búsvæði (16)	25–61 (14, 29)		0(1) 5(29)		myrkur getur hindrað spirun (1) látið ligggja í bleyti í volgu vatni í 12 klst. (29)	FYRIR & EFTIR (31)	A	
<i>Xanthium spinosum</i> (pýrnkrækir)	E opin búsvæði (16)	200 (14)	B = M (14) B > M (6)	10 (6)		rispun (14) engin sérstök meðferð (6)	FYRIR & EFTIR (6)	A	

ÆTT Tegund Grasafræðiheiti (Íslenskt heiti)	Líftími (1) og búsvæði	Fræbygnd (mg)	Ljóslofta fyrir spírur eða vöxt (2)	Sáningardýpt (mm) (3)	Spíruntími (dagar) (4)	Sérstök meðferð (5)	Eiturhrifaprófum (6)	Fræbingjar (7)	Aðrar heimildir (8)
<i>Xanthium strumarium</i> (krækkljúrt)	E akrar, opin búsvæði (16)	67,4 (14)	B = M (14)	10–20 (6, 21)		engin sérstök meðferð (6, 14, 21)	FYRIR & EFTIR (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (hrafnaklukka)	F akrar, vegarkantar, svörtur (16, 19)	0,6 (14, 19)	B = M (14)	0 (19)	5 (50%) (19) 15 (98%) (18)	myrkur hindrar spírur (18, 19) engin sérstök meðferð (5, 14, 22)	EFTIR (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (munkahetta)	F (16)	0,21 (14)	B = M (14)		< 14 (100%) (14, 25)	proskun getur verið naúðsynleg (18) engin sérstök meðferð (5, 14, 15, 22–26)	EFTIR (5, 15, 22–26)	F	
CHENOPODIACEAE <i>Chenopodium album</i> (hélunjóli)	E akurjæðrar, röskuð svæði (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	B = M (14)	0 (1, 19)	2 (50%) (19)	mismunandi meðhöndlun sem ræðst af lít fræs (19) dvali við geymslu á þurrum stað (19) myrkur hindrar spírur (1, 18, 19) kuldameðferð (18) engin sérstök meðferð (14, 34)	FYRIR & EFTIR (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (jóhannesarjurt)	F akrar, akurland, opin búsvæði (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	B = M (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90%) (18)	myrkur hindrar spírur (1, 18, 19) engin sérstök meðferð (5, 14, 15, 25, 27)	EFTIR (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (sumarvafklukka)	E vegarkantar, opin búsvæði, komakrar (16)	28,2 (14)	B > M (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100%) (10)	ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírur (1) engin sérstök meðferð (6, 21)	FYRIR & EFTIR (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (völusveipsef)	F akurland, beitiöld, vegarkantar (16, 30)	0,2 (14)	B = M (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91%) (10)	myrkur hindrar spírur (1) engin sérstök meðferð (6, 10, 14)	FYRIR & EFTIR (6, 28, 31)	B	7

ÆTT Tegund Grasafræðiheiti (Íslenskt heiti)	Líftími (1) og búsvæði	Fræbyggd (mg)	Ljóslofa fyrir spírur eða vöxt (2)	Sáningardýpt (mm) (3)	Spirunartími (dagar) (4)	Sérstök meðferð (5)	Eitunhrifaþróun (6)	Fræbingjar (7)	Aðrar heimildir (8)
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (akurmariskór)	F grösug svæði, vegarkantar, opin búsvæði (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	B = M (14)		1 (50%) (19)	rispun (14, 19) ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírur (18, 19) engin sérstök meðferð (23, 25)	EFTIR (5, 23, 25)	A, D, E, F	
<i>Senna obtusifolia</i> (sojasenna)	E rakt skóglendi (16)	23-28 (9)	B = M (14) B > M (9)	10-20 (6,9)		látið fræin liggja í bleyti í vatni í 24 klst. (9) rispun (14) lífvænleiki fræs er mismunandi eftir lit (1) engin sérstök meðferð (6)	EFTIR (6,9)	A	
<i>Sesbania exaltata</i>	E árfamburðarjarðvegur (16)	11-13 (9, 14)	B > M (9)	10-20 (9, 21)		látið fræin liggja í bleyti í vatni í 24 klst. (9) ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírur (1) engin sérstök meðferð (21)	FYRIR & EFTIR (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> (rauðsmári)	F akrar, vegarkantar, akurland (16, 19)	1,4-1,7 (14, 19)	B = M (14)		1 (50%) (19)	rispun (14, 18) getur þurft þroskun (19) ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírur (1, 19) engin sérstök meðferð (5)	EFTIR (5)	A, E, F	
LAMIACEAE <i>Leonurus cardiaca</i> (ljónshali)	F opin svæði (16)	0,75-1,0 (4, 14)	B = M (14)	0 (4)		engin sérstök meðferð (4, 14)	EFTIR (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (garðminta)	F rök svæði (16)	2,21 (4)		0 (4)		engin sérstök meðferð (4)	EFTIR (4)	F	

ÆTT Tegund Grasafræðiheiti (Íslenskt heiti)	Líftími ⁽¹⁾ og búsvæði	Fræþyngd (mg)	Ljóslofa fyrir spírun eða vöxt (²)	Sáningardýpt (mm) ⁽³⁾	Spírunartími (dagar) ⁽⁴⁾	Sérstök meðferð ⁽⁵⁾	Eitunhrifaþrófun (⁶)	Fræþingjar ⁽⁷⁾	Aðrar heimildir (⁸)
<i>Nepeta cataria</i> (kattarnipa)	F röskuð svæði (16)	0,54 (4, 14)	B = M (14)	0 (4)		engin sérstök meðferð (2, 4, 14)	EFTIR (2,4)	F	
<i>Prunella vulgaris</i> (bláakolla)	F ræktanleg svæði, grösug svæði, röskuð svæði (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	B = M (14)	0 (4, 19)	5 (50%) (19) 7 (91%) (18)	myrkur hindrar spírun (18, 19) meiri spírun með stærra fræi (1) engin sérstök meðferð (4, 14, 22)	EFTIR (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (hulduljós)	F graslendi, akurjaðrar (19)	14–18 (14, 19)	B = M (14)		7 (50%) (19)	engin sérstök meðferð (5, 14, 22)	EFTIR (5, 22)	F	
MALVACEAE <i>Abutilon theophrasti</i> (sumarlukt)	E akrar, opin búsvæði (16)	8,8 (14)	B = M (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84%) (10)	rispun (14) engin sérstök meðferð (5, 10, 21)	FYRIR & EFTIR (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> (broddsiða)	E akrar, vegarkantar (16)	3,8 (14)	B = M (14)	10–20 (6, 21)		rispun (14) ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírun (1) engin sérstök meðferð (6, 21)	FYRIR & EFTIR (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (deplasól)	E akrar, akurland, röskuð svæði (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	B = M (14)	0 (4, 29)	4 (50%) (19)	kuldameðferð og rispun (1, 19, 32) engin sérstök meðferð (4, 14, 29)	EFTIR (4)	A, D, E, F, G	

ÆTT Tegund Grasafræðiheiti (Íslenskt heiti)	Líftími ⁽¹⁾ og búsvæði	Fræþyngd (mg)	Ljóslofa fyrir spírur eða vöxt (²)	Sáningardýpt (mm) ⁽³⁾	Spírurartími (dagar) ⁽⁴⁾	Sérstök meðferð ⁽⁵⁾	Eitunhrifaþrófun (⁶)	Fræþingjar ⁽⁷⁾	Aðrar heimildir (⁸)
POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (hálingresi)	grasflatur, beittlönd (16)	0,07 (14)	B > M (10)	20 (10)	10 (62%) (10)	myrkur hindrar spírur (1, 17, -19) engin sérstök meðferð (10)	EFTIR (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (akurlöngras)	E akrar, opin búsvæði (16)	0,9-1,6 (29, 34)	B = M (14)	2 (29)	< 24 (30%) (34)	rispun (14) meðhöndlað með 101 mg/LKNO ₃ (14) hitameðferð (1) myrkur hindrar spírur (1) engin sérstök meðferð (34)	FYRIR & EFTIR (28, 34)	A	32
<i>Avena fatua</i> (flughafnar)	E ræktað land, opin búsvæði (16)	7-37,5 (14, 30)	B = M (14) B > M (6)	10-20 (6, 10)	3 (70%) (18)	rispun (7, 32) myrkur hindrar spírur (1) kuldameðferð (1, 18) engin sérstök meðferð (6, 10, 14)	FYRIR & EFTIR (6, 10, 28, 31)	A	
<i>Bromus tectorum</i> (þakfax)	E akrar, vegarkantar, akurland (16)	0,45-2,28 (14, 29)	B = M (14)	3 (29)		þroskunartími (1, 7, 32) birta hindrar spírur (1) engin sérstök meðferð (14)	FYRIR & EFTIR (28, 31)	A	
<i>Cynosurus cristatus</i> (kambgras)	F akrar, vegarkantar, opin búsvæði (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	B = M (14)	0 (29)	3 (50%) (19)	ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírur (19) engin sérstök meðferð (14, 29)	EFTIR (5)	A	

ÆTT Tegund Grasafræðiheiti (Íslenskt heiti)	Líftími ⁽¹⁾ og búsvæði	Fræþyngd (mg)	Ljóslofa fyrir spírur eða vöxt (²)	Sáningardýpt (mm) (³)	Spírurartími (dagar) (⁴)	Sérstök meðferð (⁵)	Eitunhrifaþrófun (⁶)	Fræþingjar (⁷)	Aðrar heimildir (⁸)
<i>Digitaria sanguinalis</i> (loðingragras)	E akrar, svörður, opin búsvæði (16)	0,52–0,6 (14, 30)	B = M (14)	10–20 (21)	7 (75%) 14 (94%) (7)	rispun, kuldameðferð og proskun (1, 7, 14, 32) meðhöndlað með 101 mg/L KNO ₃ (14) myrkrur hindrar spírur (1) engin sérstök meðferð (21)	FYRIR & EFTIR (18, 25, 31)	A	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (hæmsnahrsi)	E (16)	1,5 (14)	B = M (14) B > M (3)	10–20 (7, 21)		rispun (7, 32) ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírur (1) engin sérstök meðferð (3, 14, 21)	FYRIR & EFTIR (3, 21, 28, 31)	A	
<i>Elymus canadensis</i> (kanadamelur)	F árbakki, röskuð svæði (16)	4–5 (14, 30)	B = M (11)	1 (11)	14–28 (11)	engin sérstök meðferð (2, 11)	EFTIR (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (hávingull)	F akrar, rök svæði (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	B = M (14) B > M (10)	20 (10)	9 (74%) (10) 2 (50%) (19)	engin sérstök meðferð (10, 19)	EFTIR (10)	A	7
<i>Hordeum pusillum</i> (dvergbygg)	E beitilönd, vegarkantar, opin búsvæði (16)	3,28 (14)				hitameðferð (1) ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírur (1)	FYRIR (31)		7
<i>Phleum pratense</i> (vallarfoxgras)	F beitilönd, ræktanleg svæði, röskuð svæði (16, 19)	0,45 (14, 19)	B > M (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74%) (10) 8 (50%) (19)	myrkrur hindrar spírur (19) ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírur (17) engin sérstök meðferð (10, 14, 17, 19)	EFTIR (10)	A, E	

ÆTT Tegund Grasafræðiheiti (Íslenskt heiti)	Líftími (1) og búsvæði	Fræbygging (mg)	Ljóslosta fyrir spírur eða vöxt (2)	Sáningardýpt (mm) (3)	Spírurartími (dagar) (4)	Sérstök meðferð (5)	Eitunhrifaþrófun (6)	Fræbygging (7)	Aðrar heimildir (8)
POLYGONACEAE <i>Polygonum convolvulus</i> (vafsaúra)	E opin búsvæði, vegarkantir (16)	5-8 (4, 14, 29)	B = M (20)	0-2 (4, 29)		kuldameðferð í 4-8 vikur (1, 2, 4, 20, 29) ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírur (1)	FYRIR & EFTIR 1, 2, 20, 28, 31	A	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (lóblaðka)	E rakur jarðvegur (16)	1,8-2,5 (14)	B > M (6)		5 (94%) (18)	ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírur (1) myrkur hindrar spírur (18) kuldameðferð (1) engin sérstök meðferð (5)	FYRIR & EFTIR (6)	A, E	
<i>Polygonum pennsylvanicum</i> (fluglasúra)	E akrar, opin búsvæði (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		kuldameðferð í 4 vikur við 0-5 °C (1, 29) myrkur hindrar spírur (1)	FYRIR (31)	A, E	
<i>Polygonum persicaria</i> (flóajurt)	E röskuð svæði, akurland (16, 19)	2,1-2,3 (14, 19)	B > M (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50%) (19)	rispun, kuldameðferð og þroskun, GA-meðhöndlun (14) kuldameðferð, þroskun (17-19) myrkur hindrar spírur (19) engin sérstök meðferð (13)	EFTIR (13)	A	32
<i>Rumex crispus</i> (hrukkunjóli)	F ræktanleg svæði, opin svæði við vegarkanta (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	B = M (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50%) (19) 6 (100%) (33)	myrkur hindrar spírur (18, 19) þroskun getur verið nauðsynleg (18) engin sérstök meðferð (4, 14, 33)	EFTIR (4, 33)	A, E	32

ÆTT Tegund Grasafræðiheiti (islenskt heiti)	Líftími (1) og búsvæði	Fræþyngd (mg)	Ljóslofta fyrir spírúun eða vöxt (2)	Sáningardýpt (mm) (3)	Spírúunartími (dagar) (4)	Sérstök meðferð (5)	Eitunhrifaþrófun (6)	Fræþingjar (7)	Aðrar heimildir (8)
PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (nónblóm)	E ræktanleg svæði, opin svæði, röskuð svæði (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	B = M (14)		1 (50%) (19)	kuldameðferð, GA- meðhöndlun (1, 14, 18, 19, 32) birta er nauðsynleg til spírúunar (1) engin sérstök meðferð (2, 4)	EFTIR (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (brennisóley)	F ræktanleg svæði, vegarkantjar, opin svæði (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	B = M (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	engin sérstök meðferð (5, 14, 22, 24–26)	EFTIR (5, 22, 24–26)		32
ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (sólalaffill)	F limgerði, rök svæði (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	B = M (14)	0 (19)	5 (50%) (19) 16 (79%) (18)	myrkur hindrar spírúun (18, 19) hitameðferð (1) engin sérstök meðferð (5, 14, 22, 25, 26)	EFTIR (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (krókamaðra)	E ræktanleg svæði, rök svæði, röskuð svæði (16, 19)	7–9 (14, 19)	B = M (14)		5 (50%) (19) 6 (100%) (18)	kuldameðferð (1, 18, 19) ágeislunarstyrkur hefur ekki áhrif á spírúun (18, 19) birta hindrar spírúun (1) engin sérstök meðferð (6, 14)	FYRIR & EFTIR (6, 28)	A	32
<i>Galium mollugo</i> (mjúkamaðra)	F túngarðar (e. <i>headbanks</i>), opin svæði (8)	7 (29)	B = M (14)	2 (29)		engin sérstök meðferð (5, 14, 22, 24, 26, 29)	EFTIR (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (fingurbjargarblóm)	T, F limgerði, opin svæði (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	B = M (14)	0 (4, 19)	6 (50%) (19) 8 (99%) (18)	myrkur hindrar spírúun (1, 17–19) engin sérstök meðferð (4, 22–26)	EFTIR (4, 22–26)	D, G, F	

ÆTT Tegund Grasafræðiheiti (Íslenskt heiti)	Líftími ⁽¹⁾ og búsvæði	Fræþyngd (mg)	Ljóslofa fyrir spírun eða vöxt (²)	Sáningardýpt (mm) ⁽³⁾	Spírunartími (dagar) ⁽⁴⁾	Sérstök meðferð ⁽⁵⁾	Eitunhrifaþrófun (⁶)	Fræþingjar ⁽⁷⁾	Aðrar heimildir (⁸)
<i>Veronica persica</i> (varmadepla)	E ræktanleg svæði, opin svæði, röskuð svæði (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	B = M (14)	0 (19)	3(19) 5 (96%) (18)	myrkur hindrar spírun (18, 19), kuldameðferð (18) engin sérstök meðferð (14)	FYRIR & EFTIR (28)	A	32

(1) E = Einaerar, T = Tvíærar, F = Fjólærar.
(2) Heimildir 11, 14 og 33 vísa til hlutfalls birtu (B) og myrkurs (M) sem þarf til að framkalla spírun fræs. Heimildir 3, 6, 9, 10, 13, 20 vísa til vaxtarskilyrða í gróðurhúsum.
(3) 0 mm gefur til kynna að fræti hafi verið sæð á jarðvegshorðri eða þá að fræð þurfi birtu til að spíra.
(4) Tölur sem eru gefnar upp sýna hvaða hundraðshlutfall fræs spíraði á fjölda daga samkvæmt meðfylgjandi heimild, t.d. 3 dagar (50%) spírun (heimild 19).
(5) Tímalengd þroskunar og/ eða hitastigsmeðferðar liggur ekki alltaf fyrir. Þar sem hitastýring í prófunum í gróðurhúsum er takmörkuð eru hitaskilyrði eru ekki tilgreind, nema að því er varðar kröfur um kaldmeðhöndlun. Flest fræ spíra við venjulegar hitastigssveiflur í gróðurhúsum.
(6) Gefur til kynna að tegund hafi verið notuð í prófun á eitunhrifum á plöntur með illgresiseyði, annað hvort fyrir uppkomu (FYRIR) eða eftir uppkomu (EFTIR).
(7) Gefur dæmi um birgja sölufræs.
(8) Gefur tvær aðrar heimildir sem voru notaðar.

Fræbirgjar sem eru tilgreindir

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

HEIMILDIR SEM VÍSAÐ ER Í

- 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 sulfonyleurea 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., Pfeleger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 15(7):1189-1196.
- 14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgekew.org.uk/data/sid)
- 15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environmental Pollution*, 114:21-28.
- 16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY
- 17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. *Annals of Applied Biology*, 98:555-558.
- 18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*, 69:1017-1059.
- 19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London
- 20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.). *Weed Research*, 34:453-459.
- 21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. *Weed Science*, 40:227-232.
- 22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution*, 59:71-86.
- 23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. *Environmental Pollution*, 69:223-235.
- 24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. *Environmental Pollution*, 73:25-42.
- 25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agriculture, Ecosystems, & Environment*, 45:283-293.

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

4. viðbætur

Dæmi um viðeigandi vaxtarskilyrði fyrir tiltekna nytjaplöntutegundir

Komið hefur í ljós að eftirfarandi skilyrði eru hentug fyrir 10 nytjaplöntutegundir og hægt er að nota þau sem leiðbeinandi fyrir prófanir í ræktunarkössum, einnig með tilteknum öðrum tegundum:

Styrkur koltvísýrings: 350 ± 50 milljónarhlutar.

Rakastig: $70 \pm 5\%$ á birtutímabilum og $90 \pm 5\%$ á myrkurtímabilum.

Hitastig: 25 ± 3 °C yfir daginn, 20 ± 3 °C yfir nóttina.

Ljóslofta: 16 klst. birta/8 klst. myrkur þannig að meðalbylgjulengd sé 400 til 700 nm.

Birta: ljómi 350 ± 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, mælt efst í laufpakinu.

Nytjaplöntutegundirnar eru:

- tómatar (*Solanum lycopersicon*),
 - gúrkur (*Cucumis sativus*),
 - salat (*Lactuca sativa*),
 - sojabaunir (*Glycine max*),
 - kál (*Brassica oleracea* var. *capitata*),
 - gulrætur (*Daucus carota*),
 - hafrar (*Avena sativa*),
 - fjölærar rýgresistegundir (*Lolium perenne*),
 - maís (*Zea mays*),
 - laukar (*Allium cepa*).
-

C.32. ÆXLUNARPRÓFUN Á POTTORMUM (ENCHYTRAEID)

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 220 um prófanir (2004). Hún er ætluð til notkunar við að meta áhrif íðefna á viðkomu pottorma, *Enchytraeus albidus* Henle 1873, í jarðvegi. Hún byggist að mestu á aðferð sem þróuð var af Umhverfisstofnun, Þýskalandi (1. heimild), sem hefur verið hringprófuð (2. heimild). Aðrar aðferðir til að prófa eiturrif íðefna á pottorma og ánamaðka voru einnig hafðar í huga (3.–8. heimild).

ATRÍÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

2. Jarðvegslíðormar af ættkvíslinni *Enchytraeus* hafa vistfræðilega þýðingu í visteiturefnafræðilegum prófunum. Þó að pottorma sé oft að finna í jarðvegi sem í eru ánamaðkar eru þeir einnig oft útbreiddir í jarðvegi þar sem ánamaðka er ekki að finna. Hægt er að nota pottorma í prófanir á rannsóknarstofu sem og í rannsóknir sem fara að hluta til fram á vettvangi og vettvangsrannsóknir. Frá hagnýtu sjónarhorni séð er auðvelt að meðhöndla og rækta margar tegundir pottorma og kynslóðartími þeirra er marktækt styttri en ánamaðka. Tímalengd æxlunarprófunar með pottormum er því einungis 4–6 vikur en með ánamöðkum (*Eisenia fetida*) eru það 8 vikur.
3. Grunnupplýsingar um vistfræði og visteiturefnafræði pottorma í umhverfi á landi er að finna í 9.–12. heimild.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

4. Fullvaxnir pottormar eru látnir verða fyrir váhrifum af prófunariðefni á sviði styrkbíla, blönduðu í tilbúinn jarðveg. Hægt er að skipta prófuninni í tvö þrep: a) skammtastærðarrannsókn, ef nægar upplýsingar eru ekki fyrirliggjandi, en þar er dánartíðni helsti endapunkturinn sem er metinn eftir váhrif í tvær vikur og b) endanleg æxlunarprófun þar sem heildarfjöldi ungvíðis undaneldisdýranna og lifun undaneldisdýranna eru metin. Tímalengd endanlegu prófananna er sex vikur. Eftir þrjár vikur eru fullvöxnu ormarnir fjarlægðir og formfræðilegar breytingar skráðar. Eftir þrjár vikur til viðbótar er talinn fjöldi afkvæma sem skriða úr egghyllkjum sem fullvöxnu dýrin gefa af sér. Viðkoma dýranna sem verða fyrir váhrifum af prófunariðefninu er borin saman við viðkomu samanburðarhópanna til að ákvarða i) styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) og/eða ii) EC_x (t.d. EC_{10} , EC_{50}) með því að nota aðhvarfslíkan til að meta styrkinn sem veldur $x\%$ minnkun í viðkomu. EC_x skal liggja innan styrkleikanna í prófuninni (t.d. EC_{10} , EC_{50}) þannig að EC_x fái við innreikning frekar en framreikning.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

5. Æskilegt er að vatnsleysni, $\log K_{ow}$, deilistuðull milli jarðvegs og vatns, (t.d. kafli C.18 eða C.19 í þessum viðauka) og gufuþrýstingur fyrir prófunariðefnið séu þekkt. Viðbótarupplýsingar um afdrif prófunariðefnisins í jarðvegi, s.s. hraði ljósrofs og vatnsrofs, eru æskilegar.
6. Hægt er að nota þessa prófunaraðferð fyrir vatnsleysanleg eða óleysanleg íðefni. Þó mun ísetning prófunariðefnisins verða mismunandi til samræmis við það. Prófunaraðferðin á ekki við fyrir roksgjörn íðefni, þ.e. íðefni þar sem fasti samkvæmt Henry og/eða deilistuðull loftsvatns er hærri en einn, eða íðefni með gufuþrýsting yfir 0,0133 Pa við 25 °C.

GILDI PRÓFUNARINNAR

7. Til að prófun teljist gild skal samanburðarhópurinn eða hóparnir uppfylla eftirfarandi viðmiðanir:
 - dánartíðni hjá fullvöxnum dýrum skal ekki fara yfir 20% við lok skammtastærðarrannsóknarinnar og eftir fyrstu þrjár vikur æxlunarprófunarinnar,
 - að því gefnu að 10 fullvaxin dýr hafi verið sett í hvert ílát þegar prófunin var sett af stað skulu að meðaltali a.m.k. 25 ungvíði hafa orðið til í hverju íláti við lok prófunarinnar,
 - fráviksstuðull frá meðalfjölda ungvíðis skal ekki vera meiri en 50% í lok æxlunarprófunarinnar.

Ef prófun uppfyllir ekki ofangreindar gildisviðmiðanir skal stöðva prófunina nema hægt sé að leggja fram rök fyrir því að halda prófuninni áfram. Rökstuðningurinn skal koma fram í prófunarskýrslunni.

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

8. Prófa skal viðmiðunariðefni, annað hvort með reglulegu millibili eða mögulega sem hluta af hverri prófun, til að sannreyna að svörun prófunarlífveranna hafi ekki tekið umtalsverðum breytingum með tímanum. Karbendasím er hentugt viðmiðunariðefni en komið hefur í ljós að það hefur áhrif á lifun og æxlun pottorma (13.–14. heimild), einnig er hægt að nota önnur íðefni sem hafa eiturrif sem eru vel þekkt. Karbendasímsamsetning, þekkt undir viðskiptaheitinu Derosal™ sem kom frá AgrEvo Company (Frankfurt, Þýskaland) og innihélt 360 g/l (32,18%) af virku efni, var notuð í hringprófun (2. heimild). EC₅₀ fyrir æxlun, sem var ákvarðað í hringprófuninni, var á bilinu 1,2 ± 0,8 mg af virku efni/kg þurrmassa (2. heimild). Ef jákvæður eiturefnastaðall er hafður með í prófanaröðinni er notaður einn styrkleiki og fjöldi samanburðarhópa skal vera sá sami og fjöldi samhliða prófana. Að því er varðar karbendasím er mælt með prófun á 1,2 mg virku efni/kg þurrvigt (prófað sem fljótandi samsetning).

LÝSING Á PRÓFUNINNI

Búnaður

9. Prófunarlátin skulu vera úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Glerkrukkur (t.d. rúmmál: 0,20–0,25 lítrar, þvermál: ≈ 6 cm) eru hentugar. Ílátin skulu vera með gagnsæ lok (t.d. gler eða pólýetýlen) sem eru hönnuð til að draga úr vatnsuppgufun jafnframt því að gefa kost á loftskiptum milli jarðvegs og andrúmslofts. Lokin skulu vera gagnsæ til að hleypa birtu í gegn.
10. Nota þarf venjulegan rannsóknarstofubúnað, einkum eftirfarandi:
 - þurrskáp,
 - víðsjá,
 - sýrustigsmæli og ljósmæli,
 - hentugar, nákvæmar vogir,
 - fullnægjandi búnað til hitastýringar,
 - fullnægjandi búnað til rakastýringar (ekki nauðsynlegt ef váhrifalátin eru með lok),
 - ræktunarkassa eða lítið herbergi með loftræstingu,
 - tangir, króka eða lykkjur,
 - framköllunarbakki.

Tilreiðsla á tilbúna jarðveginum

11. Í þessari prófun er notaður tilbúinn jarðvegur (5. og 7. heimild) sem hefur eftirfarandi samsetningu (byggt á þurrvigt, þurrkað í stöðuga þyngd við 105 °C):
 - 10% mosamór, loftþurrkaður og fínmalaður (kornastærð 2 ± 1 mm er ásættanleg); mælt er með að athuga að jarðvegur sem er tilreiddur með nýjum móskaumti henti til að rækta ormana áður en hann er notaður í prófun,
 - 20% kaólinleir (kaólitínnihald helst yfir 30%),

- u.þ.b. 0,3 til 1,0% kalsíumkarbónat (CaCO_3 , malað í duft, greiningarhreinleiki) til að ná pH-gildinu $6,0 \pm 0,5$; magn kalsíumkarbónats sem bætt er við ræðst e.t.v. fyrst og fremst af gæðum/eðli mósin,
- u.þ.b. 70% loftþurrkaður kvarssandur (fer eftir því magni kalsíumkarbónats sem þörf er á), aðallega finn sandur með yfir 50% af ögnum á bilinu 50 til 200 míkron.

Ráðlegt er að sýna fram á hentugleika tilbúins jarðvegs til að rækta ormana og til að ná gildisviðmiðunum prófunarinnar áður en jarðvegurinn er notaður í endanlega prófun. Einkum er mælt með því að framkvæma slíka athugun til að tryggja að nothæfi prófunarinnar sé ekki teft í tvísýnu ef lífrænt kolefnisinnihald tilbúna jarðvegsins er minnkað, t.d. með því að minnka móinnihaldið í 4–5% og auka sandinnihaldið til samræmis við það. Með því að draga svona úr lífrænu kolefnisinnihaldi gætu möguleikar á ásogi prófunariðefnisins á jarðveginn (lífrænt kolefni) minnkað og aðgengileiki prófunariðefnisins fyrir ormana gæti aukist. Sýnt hefur verið fram á að *Enchytraeus albidus* getur uppfyllt gildisviðmiðanir um æxlun við prófanir í jarðvegi sem inniheldur minna af lífrænu kolefni en getið er hér að framan, t.d. 2,7% (15. heimild), og reynslan hefur sýnt, þó að takmörkuð sé, að þeim sé einnig unnt að ná í tilbúnum jarðvegi með 5% mó.

Athugasemd: Þegar náttúrulegur jarðvegur er notaður í viðbótarprófun (t.d. efra aðferðarþrepi) skal einnig sýna fram á hentugleika jarðvegsins og að gildisviðmiðanir prófunarinnar náist.

12. Þurrinnihaldsefnum jarðvegsins er blandað vel saman (t.d. í stórum rannsóknarstofublandara). Þetta skal gera a.m.k. viku áður en prófun hefst. Geyma skal blandaða jarðveginn í tvo daga til að jafnvægisstilla/stöðga sýrustigið. Til að ákvarða sýrustig er notuð blanda af jarðvegi og 1 M kalíumklóríðlausn (KCl) eða 0,01 M kalsíumklóríðlausn (CaCl_2) í hlutfallinu 1:5 (sjá 16. heimild og 3. viðbæti). Ef jarðvegurinn er súrari en tilskilið styrkbil (sjá 11. lið) er hægt að stilla hann með því að bæta við viðeigandi magni af kalsíumkarbónati (CaCO_3). Ef jarðvegurinn er of basískur er hægt að stilla hann með því að bæta við meira af blöndunni, sem um getur í 11. lið, en sleppa kalsíumkarbónatinu.
13. Hámarksvatnsheldni tilbúna jarðvegsins er ákvörðuð í samræmi við verkferlana sem er lýst í 2. viðbæti. Einum eða tveimur dögum áður en prófun hefst er þurr, tilbúinn jarðvegur forrakabættur með því að bæta við hann nægilega miklu af afjónuðu vatni til að ná u.þ.b. helmingnum af endanlegu vatnsinnihaldi, en það er 40 til 60% af hámarksvatnsheldni. Við upphaf prófunarinnar er forrakabætta jarðveginum skipt í hluta sem samsvara fjölda prófunarstyrkleika (og viðmiðunariðefna, eftir því sem við á) og samanburðarhópa sem eru notaðir í prófunina. Rakainnihald er stillt í 40–60% af hámarksvatnsheldni með því að bæta prófunariðefnislausninni við og/eða með því að bæta við eimuðu eða afjónuðu vatni (sjá 19–21 lið). Rakainnihaldið er ákvarðað við upphaf og lok prófunarinnar (með þurrkun í stöðuga þyngd við 105 °C) og skal vera innan ákjósanlegustu marka fyrir lifun ormana. Hægt er að gera einfalda athugun á rakainnihaldi jarðvegs með því að kreista jarðveginn varlega í höndinni; ef rakainnihaldið er rétt ættu litlir vatnsdropar að koma í ljós milli fingrana.

Val á prófunardýrum og undirbúningur þeirra

14. Prófunartegund sem mælt er með er *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (hvítur pottormur) sem tilheyrir ættinni Enchytraeidae (ættbálkur Oligochaeta, fylking Annelida). *E. albidus* er ein af stærstu tegundum pottorma og skráð hafa verið dýr sem eru allt að 35 mm á lengd (17.–18. heimild). *E. albidus* finnst um allan heim og er að finna á búsvæðum í sjó, ferskvatni og á búsvæðum á landi, aðallega í rotandi lífrænu efni (þangi og þara, meltu) en sjaldan á engjum (9. heimild). Viðtækt vistfræðilegt þol þeirra og svolitill formfræðilegur breytileiki benda til að ólíkar undirtegundir séu til.
15. *E. albidus* er hægt að kaupa sem fiskafóður. Athuga skal hvort ræktunin sé menguð af öðrum, yfirleitt minni tegundum (1. og 19. heimild). Ef mengun verður skal þvo alla orma með vatni í petriskál. Síðan skal velja stór, fullvaxin *E. albidus* dýr (með víðsjá) til að hefja nýja ræktun og öllum öðrum ornum er fleygt. Auðvelt er að rækta *E. albidus* í ýmiss konar lífrænum efnum (sjá 4. viðbæti). Lífsferill *E. albidus* er stuttur því þeir verða fullvaxta á bilinu 33 daga (við 18 °C) til 74 daga (við 12 °C) (1). Einungis skal nota ræktanir í prófanir sem hafa verið geymdar án vandkvæða á rannsóknarstofu í a.m.k. 5 vikur (ein kynslóð).

16. Aðrar tegundir af ættkvíslinni *Enchytraeus* henta einnig, t.d. *E. buchholzi* Vejdvosky 1879 eða *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (sjá 5. viðbæti). Ef aðrar tegundir af *Enchytraeus* eru notaðar skal tilgreina þær á skýran hátt og greina frá rökum fyrir vali á tegundinni.
17. Dýrin sem notuð eru í prófunina eru fullvaxnir ormar. Þau skulu vera með egg (hvíta bletti) á gjarðarsvæðinu og vera hér um bil af sömu stærð (u.þ.b. 1 cm á lengd). Samstilling á ræktunareldinu er ekki nauðsynleg.
18. Ef pottormarnir eru ekki ræktaðir í sömu jarðvegsgerð og við skilyrði (þ.m.t. fôðrun) sem eru notuð í endanlegu prófuninni þarf að aðlaga þá í a.m.k. 24 klst. og allt að þrjú daga. Í upphafi skal aðlaga fleiri fullvaxin dýr en þörf er á til að framkvæma prófunina til að hafa svigrúm til að hafna dýrum sem eru sködduð eða eru óhentug á annan hátt. Við lok aðlögunartímabilsins eru einungis ormar sem eru með egg og sýna ekki afbrigðilegt atferli (t.d. reyna að sleppa úr jarðveginum), valdir í prófunina. Ormarnir eru fjarlægðir varlega með griptöng, krókum eða lykkjum og settir á petrískál sem inniheldur lítið magn af fersku vatni. Endurgert ferskt vatn, eins og lagt er til í kafla C.20 í þessum viðauka (*Daphnia magna* æxlunarprófun), er ákjósanlegt í þessu skyni þar eð afjónað vatn, steinefnasneitt vatn eða kranavatn gæti verið skaðlegt fyrir ormana. Ormarnir eru skoðaðir í viðsjá og þeim sem ekki eru með egg er fleygt. Þess er gætt að fjarlægja alla mítla eða stökkmor sem gætu hafa sýkt ræktunina og fleygja þeim. Heilbrigðir ormar, sem ekki eru notaðir í prófunina, eru settir aftur í stofnræktina.

Tilreiðsla prófunarstyrkleikanna

Prófunariðefni sem er leysanlegt í vatni

19. Lausn prófunariðefnisins er tilreidd í afjónuðu vatni í magni sem nægir fyrir allar samhliða prófanir með einum prófunarstyrk. Mælt er með að nota viðeigandi magn af vatni til að fá það rakainnihald sem þörf er á, t.d. 40 til 60% af hámarksvatnsheldni (sjá 13. lið). Hverri lausn prófunariðefnisins er blandað vandlega við einn skammt af forrakabættum jarðvegi áður en hann er settur í prófunarflátið.

Prófunariðefni sem er óleysanlegt í vatni

20. Að því er varðar íðefni sem eru óleysanleg í vatni en leysanleg í lífrænum leysum er hægt að leysa prófunariðefnið upp í minnsta mögulega magni af hentugu burðarefni (t.d. asetoni). Einungis skal nota rokgjarna leysa. Burðarefninu er údað á eða blandað við lítið magn, t.d. 2,5 g, af finum kvarssandi. Burðarefnið er fjarlægt með uppgufun í súgskáp í a.m.k. eina klst. Þessari blöndu af kvarssandi og prófunariðefni er bætt í forrakabættan jarðveg og blandað vandlega saman eftir að viðeigandi magni af afjónuðu vatni er bætt við til að fá það rakainnihald sem þörf er á. Lokablandan er sett í prófunarflátin.
21. Að því er varðar íðefni sem eru torleysanleg í vatni og lífrænum leysum er jafngildi 2,5 g af finmöluðum kvarssandi á hvert prófunarflát blandað með magninu af prófunariðefninu til að fá tilætlaðan prófunarstyrk. Þessari blöndu af kvarssandi og prófunariðefni er bætt í forrakabættan jarðveg og blandað vandlega saman eftir að viðeigandi magni af afjónuðu vatni er bætt við til að fá það rakainnihald sem þörf er á. Lokablöndunni er skipt á milli prófunarflátanna. Aðferðin er endurtekin fyrir hvern prófunarstyrk og viðeigandi samanburður er einnig tilreiddur.
22. Alla jafna skal ekki prófa íðefni í meiri styrk en 1000 mg/kg af þurrmassa jarðvegs. Þó getur reynst þörf á prófunum með hærri styrk í samræmi við markmið tiltekinnar prófunar.

FRAMKVÆMD PRÓFANANNA

Prófunar- og samanburðarhópar

23. Að því er varðar hvern prófunarstyrk er prófunarjarðvegur, sem að magni svarar til 20 g þurrvigtar, settur í prófunarflát (sjá liði 19–21). Samanburðarhópar án prófunariðefnisins eru einnig tilreiddir. Einnig er fôðri bætt í hvert flát í samræmi við verkferlana sem lýst er í 29. lið. Í hvert prófunarflát eru settir tíu ormar af handahófi.

Ormannir eru settir varlega ofan á jarðveginn í hverju prófunaríláti, t.d. með griptöng, krókum eða lykkjum. Fjöldi samhlíða prófana fyrir prófunarstyrkleikana og fjöldi samanburðarhópa ræðst af tilhögun prófunar sem er notuð (sjá 34. lið). Prófunarílátunum er raðað af handahófi í prófunarræktunarkassann og röðuninni breytt af handahófi í hverri viku.

24. Ef notað er burðarefni við ísetningu prófunariðefnisins í skal keyra eina samanburðarröð, sem inniheldur kvarssand sem er úðaður eða blandaður með leysi, til viðbótar við prófanaraðirnar. Styrkur leysisins eða dreifiefnisins skal vera sá sami og er notaður í prófunarílátunum með prófunariðefninu. Keyra skal samanburðarraðir sem innihalda viðbótarkvarssand (2,5 g á hvert ílát) fyrir iðefni sem þurfa umsjón í samræmi við verkferlana sem er lýst í 21. lið.

Prófunarskilyrði

25. Prófunarhitastigið er 20 ± 2 °C. Til að aftra ormum frá því að sleppa úr jarðveginum er prófunin framkvæmd við stýrða birtu- og myrkvunarhringrás (helst 16 klst. birta og 8 klst. myrkur) og lýsingu sem nemur 400 til 800 lúxum hjá prófunarílátunum.
26. Ílátin eru vegin í upphafi prófunarinnar, til að kanna rakastig jarðvegsins, og einu sinni í viku eftir það. Þyngdartap er bætt upp með því að bæta við viðeigandi magni af afjónuðu vatni. Hafa skal í huga að hægt er að draga úr vatnstapi með því að viðhalda háu loftrakastigi (> 80%) í prófunarræktunarkassanum.
27. Mæla skal rakainnihald og sýrustig við upphaf og lok skammtastærðarrannsóknarinnar og endanlegu prófunarinnar. Mælingar skulu gerðar í samanburðarjarðvegssýnum og meðhöndluðum jarðvegssýnum (allir styrkleikar) sem eru tilreidd og viðhaldið á sama hátt og prófunarræktirnar en eru ekki með ormum. Einungis skal bæta fœðri í þessi jarðvegssýni við upphaf prófunarinnar til að greiða fyrir virkni örvera. Magn fœðurs sem bætt er í skal vera það sama og bætt er í prófunarræktirnar. Ekki er nauðsynlegt að bæta meira fœðri í þessi ílát meðan á prófuninni stendur.

Fœðrun

28. Hægt er að nota fœður sem getur viðhaldið pottormastofninum. Komið hefur í ljós að valsaðir hafrar, helst gufusæfðir fyrir notkun til að komast hjá mengun af völdum örvera, eru hentugt fœðunarefni.
29. Fœðrið er fyrst gefið með því að blanda 50 mg af möluðum, völsuðum höfrum í jarðveginn í hverju íláti áður en ormannir eru settir í það. Eftir það er fœður gefið vikulega fram á 21. dag. Ekki er fœðrað á 28. degi því þá er búið að fjarlægja fullvöxnu dýrin og ungvíðið þarf tiltölulega lítið viðbótarfœður eftir þetta. Meðan á prófuninni stendur er fœðrað með 25 mg af völsuðum höfrum á hvert ílát, fœðrinu er komið varlega fyrir á yfirborði jarðvegsins til að komast hjá því að skaða ormana. Til að minnka sveppavöxt skal grafa hafráflögurnar í jarðveginn með því að þekja þær með litlu magni af jarðvegi. Ef fœður er ekki étið skal minnka skammtinn.

Tilhögun skammtastærðarrannsókna

30. Ef nauðsyn krefur er framkvæmd skammtastærðarrannsókn, t.d. með fimm styrkleikum prófunariðefnis sem nema 0,1, 1,0, 10, 100, og 1000 mg/kg (þurrvígt jarðvegs). Ein samhlíða prófun nægir fyrir hvern meðhöndlunarhóp og samanburðarhóp.
31. Tímalengd skammtastærðarrannsóknarinnar er tvær vikur. Við lok prófunarinnar er dánartíðni ormannna metin. Ormur er skráður dauður ef hann sýnir engin við brögd þegar afturendi hans er áreittur með snertingu. Upplýsingar til viðbótar við dánartíðnina geta einnig verið gagnlegar við ákvörðun á hvaða styrkbil á að nota í endanlegu prófuninni. Því ætti einnig að skrá breytingar á atferli fullvaxinna dýra (t.d. getur ekki grafið sig niður í jarðveginn, liggur hreyfingarlaus við glerhlið prófunarílátsins) og form og bygging (t.d. opin sár) sem og hvort ungvíði er til staðar. Hægt er að ákvarða það síðastnefnda með notkun litunaraðferðarinnar sem er lýst í 6. viðbæti.

32. Hægt er að ákvarða LC_{50} um það bil með því að reikna út faldmeðaltal gagna um dánartíðni. Þegar styrkleikabil eru fastsett fyrir endanlegu prófunina er gengið út frá því að áhrif á æxlun séu lægri en LC_{50} sem nemur stuðli sem er allt að 10. Þetta er þó samband byggt á reynslu og gæti verið öðruvísi í sérstökum tilvikum. Viðbótarathuganir sem gerðar eru í skammtastærðarrannsókninni, s.s. hvort ungvíði er fyrir hendi, geta auðveldað betrubætur á styrkleikabili prófunariðefnisins sem á að nota í endanlegu prófuninni.
33. Til að ákvarða LC_{50} nákvæmlega er mælt með því að framkvæma prófunina með því að nota a.m.k. fjórar samhlíða prófanir fyrir hvern styrkleika prófunariðefnisins og fullnægjandi fjölda styrkleika til að fá fram a.m.k. fjórar mismunandi, tölfræðilega marktækar meðalsvaranir við þessa styrkleika. Notaður er samsvarandi fjöldi styrkleika og samhlíða prófana fyrir samanburðarhópana, þegar þeir eiga við.

Tilhögun endanlegrar æxlunarprófunar

34. Þrenns konar tilhögun er lögð til á grundvelli ráðlegginga sem leiða af hringprófun (2. heimild).
- Til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif skal prófa a.m.k. fimm styrkleika í jafnhlutfallaröð. Mælt er með fjórum samhlíða prófunum fyrir hvern prófunarstyrk ásamt átta samanburðarhópum. Munurinn á styrkleikum skal nema stuðli sem fer ekki yfir 1,8.
 - Til að ákvarða EC_x (t.d. EC_{10} , EC_{50}) skal prófa a.m.k. fimm mismunandi styrkleika og EC_x skal liggja innan styrkleikanna til að unnt sé að innreikna EC_x frekar en að framreikna það. Mælt er með a.m.k. fjórum samhlíða prófunum fyrir hvern prófunarstyrkleika og fjórum samhlíða samanburðarprófunum. Bilstuðullinn getur verið breytilegur, þ.e. lægri en eða jafn og 1,8 á því bili sem búist er við að áhrif komi fram og hærri en 1,8 við meiri og minni styrk.
 - Samsett aðferð gerir það kleift að ákvarða bæði styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif og EC_x . Nota skal átta meðhöndlunarstyrkleika í jafnhlutfallaröð. Mælt er með fjórum samhlíða prófunum fyrir hvern meðhöndlunarhóp ásamt átta samanburðarhópum. Munurinn á styrkleikum skal nema stuðli sem fer ekki yfir 1,8.
35. Nota skal tíu fullvaxna orma á hvert prófunarílát (sjá 23. lið). Föðri er bætt í prófunarílátið við upphaf prófunarinnar og síðan einu sinni í viku (sjá 29. lið) fram að 21. degi og að honum meðtöldum. Á 21. degi er handleitað vandlega í jarðvegssýnunum, lifandi fullvaxnir ormar eru skoðaðir og taldir og breytingar á atferli (t.d. getur ekki grafið sig niður í jarðveginn, liggur hreyfingarlaus við glerhlið prófunarílátsins) og á formi og byggingu (t.d. opin sár) eru skráðar. Síðan eru allir fullvaxnir ormar fjarlægðir úr prófunarílátunum og prófunarjarðveginum. Prófunarjarðvegurinn, sem inniheldur egghylki sem hafa orðið til, er ræktaður í þrjár vikur til viðbótar við sömu prófunarskilyrði að því undanskildu að föðrun á sér einungis stað á 35. degi (þ.e. 25 g af möluðum völsuðum höfnum á hvert ílát).
36. Eftir sex vikur eru nýklaktir ormar taldir. Mælt er með aðferð sem byggist á Bengal-rauðri litun þó að önnur votútdráttartækni (án hita) og flottækni (sjá 6. viðauka) hafi einnig reynst hentug (4., 10.–11. og 20. heimild). Mælt er með Bengal-rauðri litun vegna þess að grugg af völdum fljótandi leiragna getur hamlað votútdrætti úr jarðvegsundirlagi.

Markprófun

37. Ef engin áhrif eru merkjanleg við hæsta styrk í skammtastærðarrannsókninni (t.d. 1000 mg/kg) er hægt að framkvæma æxlunarprófunina sem markprófun og nota 1000 mg/kg til að sýna fram á að styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif á æxlun sé hærri en þetta gildi.

Samantekt og tímaáætlun fyrir prófunina

38. Hægt er að taka saman þrepin í prófuninni sem hér segir:

Tími	Skammtastærðarrannsókn	Endanleg prófun
Dagur –7 eða fyrr	— Tilreiðsla tilbúins jarðvegs (blöndun á þurrum innihaldsefnum)	— Tilreiðsla tilbúins jarðvegs (blöndun á þurrum innihaldsefnum)
Dagur –5	— Athugun á sýrustigi tilbúins jarðvegs — Mæling á hámarksvatnsheldni jarðvegs	— Athugun á sýrustigi tilbúins jarðvegs — Mæling á hámarksvatnsheldni jarðvegs
Dagur –5 til –3	— Flokkun orma til aðlögunar	— Flokkun orma til aðlögunar
Dagur — 3 til 0	— Aðlögun orma í a.m.k. 24 klst.	— Aðlögun orma í a.m.k. 24 klst.
Dagur –1	— Forrakabæting tilbúins jarðvegs og skipting í skammta	— Forrakabæting tilbúins jarðvegs og skipting í skammta
Dagur 0	— Tilreiðsla stofnlausna — Ísetning prófunariðefnis — Vigtun undirlags fyrir prófunina í prófunarílátin — Íblöndun fôðurs — Ísetning orma — Mæling á sýrustigi jarðvegs og raka-innihaldi	— Tilreiðsla stofnlausna — Ísetning prófunariðefnis — Vigtun undirlags fyrir prófunina í prófunarílátin — Íblöndun fôðurs — Ísetning orma — Mæling á sýrustigi jarðvegs og raka-innihaldi
Dagur 7	— Athugun á rakainnihaldi jarðvegs	— Athugun á rakainnihaldi jarðvegs — Fôðrun
Dagur 14	— Ákvörðun á dánartíðni fullvaxinna dýra — Fjöldi ungvíðis áætlaður — Mæling á sýrustigi jarðvegs og raka-innihaldi	— Athugun á rakainnihaldi jarðvegs — Fôðrun
Dagur 21		— Atferli fullvaxinna dýra athugað — Fullvaxin dýr fjarlægð — Ákvörðun á dánartíðni fullvaxinna dýra — Athugun á rakainnihaldi jarðvegs — Fôðrun
Dagur 28		— Athugun á rakainnihaldi jarðvegs — Engin fôðrun

Tími	Skammtastærðarrannsókn	Endanleg prófun
Dagur 35		— Athugun á rakainnihaldi jarðvegs — Fóðrun
Dagur 42		— Ungviði orma talið — Mæling á sýrustigi jarðvegs og rakainnihaldi

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

39. Þó að yfirlit sé gefið í 7. viðbæti eru engar endanlegar tölfræðilegar leiðbeiningar um greiningu á prófunarniðurstöðum gefnar í þessari prófunaraðferð.
40. Helsti endapunktur skammtastærðarrannsóknarinnar er dánartíðni. Þó skal einnig skrá breytingar á atferli (t.d. getur ekki grafið sig niður í jarðveginn, liggur hreyfingarlaus við glerhlið prófunarilátsins) og á formi og byggingu (t.d. opin sár) fullvaxinna orma sem og hvort ungvíði er til staðar. Almennt skal nota probit-greiningu (21. heimild) eða tvíkosta aðhvarfsgreiningu til að ákvarða LC_{50} . Í tilvikum þar sem þessi greiningaraðferð hentar ekki (t.d. ef færri en þrjár styrkleikar með einhverri dánartíðni eru fyrir hendi) er þó hægt að nota staðgönguáðferðir. Meðal þessara aðferða gætu verið hlaupandi meðaltal (22. heimild), klippt Spearman-Kärber-aðferðin (23. heimild) eða einfaldur innreikningur (t.d. faldmeðaltal LC_0 og LC_{100} , eins og það er reiknað með því að margfalda kvaðratrótina af LC_0 með LC_{100}).
41. Í endanlegu prófuninni er fjósemi endapunktur prófunarinnar (þ.e. fjöldi ungvíðis sem verður til). Rétt eins og í skammtastærðarrannsókninni ætti þó að skrá öll skaðleg einkenni í lokaskýrslunni. Í tölfræðilegri greiningu þarf meðaltal og staðalfrávik fyrir hvern meðhöndlunarhóp og hvern samanburðarhóp til að reikna út æxlun.
42. Ef gerð hefur verið dreifnigreining er hægt að skipta staðalfrávikum, s , og frítölu, df , út fyrir safnað dreifnimat, sem fæst með dreifnigreiningunni, og fyrir frítölu þess, eftir því sem við á, að því tilskildu að dreifnin sé ekki háð styrknum. Í því tilviki er notuð stök dreifni í samanburðarhóp og meðhöndlunarhóp. Þessi gildi eru yfirleitt reiknuð með tölfræðihugbúnaði, sem hægt er að kaupa, og niðurstöður úr hverju íláti eru notaðar sem samhliða prófanir. Ef það virðist skynsamlegra að nota safngögn úr neikvæðum samanburðarhópum og samanburðarhópum með leysi en að gera prófun á þeim sitt í hvoru lagi ætti að staðfesta með prófun að á þeim sé ekki marktækur munur (að því er varðar viðeigandi prófanir sjá 45. lið og 7. viðbæti).
43. Frekari tölfræðilegar prófanir og ályktanir fara eftir því hvort gildi í samhliða prófunum eru normaldreifð og einsleit að því er varðar dreifni þeirra.

Mat á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif

44. Notkun á öflugum prófunum er ákjósanlegust. Nota skal upplýsingar, t.d. um fyrri reynslu af hringprófunum eða önnur rannsóknarsöguleg gögn, um það hvort gögn séu hér um bil normaldreifð. Einsleitni í dreifni (einsdreifni) er mikilvægari. Reynslan sýnir að dreifnin eykst oft með hækkandi meðaltali. Í þessum tilvikum gæti gagnavörpun leitt til einsdreifni. Slík umbreyting skal þó byggjast á reynslu af rannsóknarsögulegum gögnum fremur en gögnum sem verið er að rannsaka. Þegar um er að ræða einsleit gögn skal framkvæma margar t -prófanir, s.s. Williams-prófun ($\alpha = 0,05$, einhliða) (24.–25. heimild) eða, í tilteknum tilvikum, Dunnetts-prófun (26.–27. heimild). Hafa skal í huga að ef um er að ræða ójafna endurtekningu verður að leiðrétta t -gildin í töflunni, samanber Dunnett og Williams. Í sumum tilvikum eykst/minnkar svörnin ekki reglubundið vegna þess að dreifingin er mikil. Ef um er að ræða mikil frávik frá einhalla á Dunnetts-prófunin betur við. Ef um er að ræða frávik frá einsdreifni kann að vera skynsamlegt að rannsaka nánar hugsanleg áhrif á dreifni til að ákvarða hvort hægt er að nota t -prófanirnar án þess að glata miklum styrk. Að öðrum kosti er hægt

að nota margfalda U-prófun, t.d. Bonferroni-U-prófunina samkvæmt Holm (29. heimild) eða, ef þessi gögn sýna misdreifni en eru að öðru leyti í samræmi við undirliggjandi einhalla skammtasvörun, annað óstikabundið próf (t.d. Jonckheere-Terpstra, 30.–31. heimild, eða Shirley, 32.–33. heimild) og væri alla jafna ákjósanlegra en t-prófanir með ójafni dreifni. (sjá einnig lýsinguna í 7. viðbæti).

45. Ef markprófun hefur verið framkvæmd og forsendur stikabundinna prófunaraðferða (normleiki, einsleitni) eru uppfylltar er hægt að nota paraða t-prófun eða að öðrum kosti Mann-Whitney-U-prófunaraðferðina (29. heimild).

Mat á EC_x

46. Við útreikning á öllum EC_x -gildum eru meðaltöl fyrir hvern meðhöndlunarhóp notuð í aðhvarfsgreiningu (línulega eða ólínulega) eftir að viðeigandi skammtasvörunarfall hefur fengist. Að því er varðar vöxt orma sem samfellda svörun er hægt að áætla EC_x -gildi með því að nota hentuga aðhvarfsgreiningu (35. heimild). Meðal heppilegra falla fyrir skammtabundin gögn (dánartíðni/lífur og fjöldi afkvæma sem verða til) eru venjuleg sigmoid-föll, tvíkosta föll eða Weibull-föll, sem innihalda tvær til fjórar breytur, en sum þeirra geta einnig líkt eftir tvífasa skammtasvörun (e. *hormetic response*). Ef skammtasvörunarfallið var aðlagð með línulegri aðhvarfsgreiningu ætti að finnast marktækur r^2 (ákvörðunarstuðull) og/eða hallatala með aðhvarfsgreiningunni áður en EC_x er metið með því að setja gildi, sem samsvarar $x\%$ af meðaltali samanburðarhópsins, inn í jöfnuna sem er fundin með aðhvarfsgreiningunni. 95% öryggismörk eru reiknuð út samkvæmt Fieller (vísun í Finney, 21. heimild) eða öðrum nútímalegum, viðeigandi aðferðum.
47. Að öðrum kosti er svörunin höfð sem hundraðshlutfall eða hlutfall af líkanbreytu sem er túlkuð sem meðalsvörun samanburðarhópsins. Í þessum tilvikum er oft hægt að aðlaga venjulega (tvíkosta, Weibull-) sigmoid-ferliinn að niðurstöðunum með því að nota probit-aðhvarfsgreiningar. Í þessum tilvikum þarf að stilla þyngdarfallið fyrir mælanlegar svaranir, samkvæmt Christensen (36. heimild). Ef tvífasa hefur komið í ljós ætti þó tvíkosta fall með fjórum breytum eða Weibull-fall, aðlagð með ólínulegri aðhvarfsgreiningu (36. heimild), að koma í stað probit-greiningar. Ef ekki er hægt að aðlaga heppilegt skammtasvörunarfall að gögnunum er hægt að nota staðgönguáðferðir til að áætla EC_x og öryggismörk þess, s.s. hlaupandi meðaltal samkvæmt Thompson (22. heimild) og klippta Spearman-Kärber-aðferð (23. heimild).

PRÓFUNARSKÝRSLA

48. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunariðefni:

- eðlisástand og, ef við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli (t.d. vatnsleysni, gufuþrýstingur),
- efnafræðileg sanngreining á prófunariðefninu samkvæmt flokkunarkerfi Alþjóðasamtaka um hreina og hagnýta efnafræði, CAS-númer, framleiðslulota, lota, byggingarformúla og hreinleiki,
- fyrningardagsetning sýnis.

Prófunartegund:

- tilraunadýr sem eru notuð: tegundir, vísindaheiti, uppruni lífvera og ræktunarskilyrði.

Prófunarskilyrði:

- innihaldsefni og tilreiðsla á tilbúnum jarðvegi,
- aðferð við notkun prófunariðefnis,
- lýsing á prófunarskilyrðum, þ.m.t. hitastig, rakainnihald, sýrustig o.s.frv.,
- nákvæm lýsing á tilhögun tilraunar og verkferlum.

Prófunarniðurstöður:

- dánartíðni fullvaxinna orma eftir tvær vikur og fjöldi ungvíðis við lok skammtastærðarrannsóknarinnar,
- dánartíðni fullvaxinna orma eftir þriggja vikna váhrif og tæmandi skrá yfir ungvíði við lok endanlegu prófunarinnar,
- öll líkamleg eða meinafræðileg einkenni sem koma fram og breytingar á atferli prófunarlífveranna.
- LC₅₀, styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif og/eða EC_x (t.d. EC₅₀, EC₁₀) fyrir æxlun, ef einhver af gildunum eiga við með öryggisbilum, og línurit aðlagaða líkansins sem er notað við útreikningana, allar upplýsingar og athuganir sem koma að gagni við túlkun niðurstaðna.

Frávík frá þeim verkferlum sem lýst er í þessari prófunaraðferð og öll óvenjuleg tilvik meðan á prófuninni stendur.

HEIMILDIR

- 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) Kaffli C.8 í þessum viðauka, Eiturhrif á ánamaðka.
- 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 redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.
 - 20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.
 - 21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
 - 22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.
 - 23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.
 - 24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
 - 25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.
 - 26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple 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.
-

*1. viðbætur***Skilgreiningar**

Í þessari prófunaraðferð eru notaðar eftirfarandi skilgreiningar:

Íðefni er efni eða blanda.

EC_x (styrkur sem hefur x% áhrif) er sá styrkur sem hefur x% áhrif á prófunarlífverur innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun. Í þessari prófun er áhrifastyrkurinn gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs.

LC₀ (ekki banvænn styrkur) er sá styrkur prófunariðefnis sem drepur engar af prófunarlífverunum, sem verða fyrir váhrifum, á tilteknu tímabili. Í þessari prófun er LC₀ gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs.

LC₅₀ (miðgildisbanastyrkur) er sá styrkur prófunariðefnis sem drepur 50% af prófunarlífverunum, sem verða fyrir váhrifum, á tilteknu tímabili. Í þessari prófun er LC₅₀ gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs.

LC₁₀₀ (banvænn styrkur) er sá styrkur prófunariðefnis sem drepur 100% af prófunarlífverunum, sem verða fyrir váhrifum, á tilteknu tímabili. Í þessari prófun er LC₁₀₀ gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) er minnsti styrkur prófunariðefnisins sem hefur tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$). Í þessari prófun er minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs. Allur prófunarstyrkur yfir minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif skal alla jafna sýna áhrif sem eru tölfræðilega frábrugðin áhrifunum af samanburðinum. Rökstyðja verður öll frávik frá fyrrgreindu við sanngreiningu á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif í prófunarskýrslunni.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) er mesti styrkur prófunariðefnisins, sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif, þar sem engin áhrif koma fram. Í þessari prófun hefur styrkur, sem svarar til styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif, engin tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) á tilteknu váhrifatímabili, samanborið við samanburðarsýni.

Æxlunarhraði er meðalfjöldi ormaungviðis sem til verður á fjölda fullvaxinna dýra á prófunartímabilinu.

Prófunariðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófað með þessari prófunaraðferð.

2. viðbætur

Ákvörðun á hámarksvatnsheldni**Ákvörðun á vatnsheldni tilbúna jarðvegsins**

Eftirfarandi aðferð hefur reynst hentug. Henni er lýst í viðauka C við ISO DIS 11268-2.

Tilgreindu magni (t.d. 5 g) af prófunarjarðvegsundirlagi er safnað með hentugu áhaldi (kjarnabor o.s. frv.). Síupappír eru settur fyrir botninn á rörinu, síðan er það fyllt af vatni og sett á stand í vatnsbað. Rörið skal smám saman fært í kaf þar til vatnshæðin er ofan við hæð jarðvegsins þáð skal síðan skilið eftir í vatninu í u.þ.b. þrjár klst. Þar eð vatnið sem hárpípur í jarðveginum draga í sig situr ekki allt eftir skal láta hripa úr jarðvegssýninu í tvær klst. með því að setja rörið á beð með mjög blautum, fínuldum kvarssandi í lokuðu ílátí (til að koma í veg fyrir þornun). Síðan skal þurrka sýnið þar til það hefur náð stöðugum massa við 105 °C og vega það. Þá er hægt að reikna út vatnsheldni eftir því sem hér segir:

$$\text{Vatnsheldni (i \% af þurrmassa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Þar sem:

S = vatn-mettað undirlag + massi rörs + massi síupappírs

T = tara (massi rörs + massi síupappírs)

D = þurrmassi undirlags

HEIMILDIR:

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.

*3. viðbætur***Ákvörðun á sýrustigi jarðvegs**

Eftirfarandi aðferð við að ákvarða sýrustig jarðvegssýnis byggist á lýsingu í ISO 10390 (Soil Quality — Determination of pH).

Tilgreint magn af jarðvegi er þurrkað við stofuhita í u.þ.b. 12 klst. Síðan er tilreidd sviflausn með jarðveginum (inniheldur a.m.k. 5. g af jarðvegi) sem nemur fimmföldu rúmmáli af annað hvort 1 M af kalíumklóríði af greiningarhreinleika eða 0,01 M lausn af kalsíumklóríði af greiningarhreinleika (CaCl₂). Sviflausnin er síðan hrist rækilega í fimm mínútur. Eftir hristingu er sviflausnin látin setjast í a.m.k. 2 klst. en ekki lengur en 24 klst. Síðan er sýrustig fljótandi fasans mælt með sýrustigsmæli sem hefur verið kvarðaður fyrir hverja mælingu með viðeigandi röð jafnalausna (t.d. pH-gildi 4,0 og 7,0).

HEIMILDIR:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

4. viðbætur

Ræktunarskilyrði *Enchytraeus* sp.

Hægt er að rækta pottorma af tegundinni *Enchytraeus albidus* (sem og aðrar tegundir *Enchytraeus*) í stórum plastkössum (t.d. 30 × 60 × 10 cm) sem eru fylltir með 1:1 blöndu af tilbúnum jarðvegi og náttúrulegum, ómengduðum garðjarðvegi. Forðast skal að nota moltuefni þar eð það gæti innihaldið eitruð íðefni s.s. þungmálma. Fjarlægja skal lífverur úr jarðveginum fyrir notkun (t.d. með djúpfrystingu). Einnig er hægt að nota undirlag sem er einungis úr tilbúnum jarðvegi en æxlunarhraðinn gæti orðið minni en sá sem fæst með blönduðu jarðvegsundirlagi. Undirlagið sem er notað fyrir ræktunina skal vera með pH-gildið 6,0 ± 0,5.

Ræktunin er höfð í myrkri við hitastigið 15 til 20 °C ± 2 °C. Forðast skal hærri hita en 23 °C. Halda skal jarðveginum rökum en ekki blautum. Rétt rakainnihald hefur náðst þegar litlir vatnsdropar koma í ljós milli fingranna ef jarðvegurinn er kreistur varlega. Forðast skal að skapa súrefnisskort með því að tryggja að lok á ræktunarlátum veiti næg loftskipti við andrúmsloftið. Losa skal jarðveginn varlega sundur í hverri viku til að greiða fyrir loftun.

Hægt er að fóðra ormana á völsuðum höfrum. Völsuðu hafrarnir skulu geymdir í lokuðum ílátum og gufusæfðir eða hitaðir fyrir notkun til að forðast sýkingar af völdum hveitimítla (t.d. *Glyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) eða ránmaura (t.d. *Hypoaspis* (*Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Eftir hitameðhöndlun er fóðrið malað svo auðvelt sé að strá því á yfirborð jarðvegsins. Hægt er að blanda af og til vítamínum, mjólk og þorskalýsi við völsuðu hafrana. Önnur hentug uppspretta fódurs er brauðger og fiskafóðrið „Tetramin“.

Fóðrun fer fram u.þ.b. tvisvar í viku. Viðeigandi magni af völsuðum höfrum er stráð á yfirborð jarðvegsins eða blandað varlega í undirlagið þegar jarðvegurinn er losaður sundur til að greiða fyrir loftun. Endanlegt magn fódurs sem gefið er ræðst af fjölda orma í undirlaginu. Sem viðmiðun skal auka magn fódurs ef það er allt étið innan eins dags frá gjöf. Ef ennþá er fóður á yfirborðinu þegar næst er gefið (viku síðar) skal aftur á móti minnka fóðrið. Fjarlægja skal fóður sem er mengað af sveppavexti og setja annað í staðinn. Eftir þrjá mánuði skal flytja ormana í nýtilreitt undirlag.

Ræktunarskilyrði teljast fullnægjandi ef ormarnir: a) reyna ekki að fara úr jarðvegsundirlaginu, b) hreyfa sig hratt gegnum jarðveginn c) yfirborð þeirra er glansandi án þess að jarðvegsagnir loði við þá, d) liturinn er meira og minna hvítleitur, e) þeir eru á mismunandi aldri í ræktunum og f) æxlast samfellt.

5. viðbætur

Frankvæmd prófana með öðrum tegundum *Enchytraeus*

Val á tegund

Hægt er að nota aðrar tegundir en *E. albidus* en aðlaga skal prófunaraðferð og gildisviðmiðanir til samræmis við það. Þar eð margar *Enchytraeus*-tegundir eru auðfáanlegar og auðvelt að ala þær í rannsóknarstofunni er mikilvægasta viðmiðunin við val á annarri tegund en *E. albidus* vistfræðilegt mikilvægi svo og hvort hún hefur svipað næmi. Einnig geta verið formlegar ástæður fyrir breytingu á tegund. Í löndum þar sem *E. albidus* er ekki til og ekki er hægt að flytja hana inn (t.d. af sóttvarnarástæðum) er t.d. nauðsynlegt að nota aðra tegund *Enchytraeus*.

Dæmi um hentuga staðgöngutegund

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): Á undanförunum árum hefur þessi tegund oft verið notuð í visteiturefnafræðilegar rannsóknir vegna þess að það er einfalt að rækta hana og prófa. Á hinn bóginn er hún smávaxin sem gerir meðhöndlun erfiðari en á *E. albidus* (einkum á stigum fyrir notkun litunaraðferðarinnar). *E. crypticus* hefur ekki fundist á vettvangi með óyggjandi hætti og hefur einungis verið lýst út frá ánamaðkaræktun. Af þeim sökum eru vistfræðilegar þarfir ekki þekktar.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Þetta heiti nær sennilega yfir hóp af náskyldum tegundum sem er erfitt að aðgreina formfræðilega séð. Ekki er mælt með að nota þær í prófanir fyrr en hægt er að sanngreina einstaklingana sem notaðir eru í prófun. *E. buchholzi* er yfirleitt að finna á engjum og röskuðum svæðum, s.s. vegarköntum.
- *Enchytraeus luxuriosus*: Þessi tegund var upphaflega þekkt sem *E. „minus“* en hefur nýlega verið lýst (1. heimild). U. Graefe (Hamborg) fann hana fyrst á engi í grennd við St. Peter-Ording (Slésvík-Holtsetaland, Þýskalandi). *E. luxuriosus* er u.þ.b. helmingur af stærð *E. albidus* en stærri en hinar tegundirnar sem hér er fjallað um; hún gæti því verið góður staðgöngukostur fyrir *E. albidus*.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Fram að þessu hefur verið greint frá þessari tegund í steinefnajarðvegi í Þýskalandi og Spáni þar sem hún er algeng en yfirleitt ekki í miklu magni. Samanborið við aðrar smávaxnar tegundir af þessari ættkvísl er tiltölulega auðvelt að sanngreina hana. Ekkert er vitað um atferli hennar í prófunum á rannsóknarstofu eða næmi hennar fyrir iðefnum. Þó hefur komið í ljós að auðvelt er að rækta tegundina (E. Belotti, persónuleg orðsending).

Ræktunarskilyrði

Hægt er að rækta allar *Enchytraeus*-tegundirnar sem getið er hér að ofan í sama undirlagi og *E. albidus*. Þar eð þær eru smærri geta ræktunarlátin verið minni og þó að hægt sé að nota sama fóður verður að aðlaga skammtana. Lífsferill þessara tegunda er styttri en hjá *E. albidus* og þær skal fôðra oftar.

Prófunarskilyrði

Prófunarskilyrðin eru almennt séð þau sömu og gilda um *E. albidus* að því undanskildu að:

- prófunarlátin geta verið minni (en þurfa þess ekki),
- tímalengd æxlunarprófunarinnar getur verið styttri (en þarf þess ekki), þ.e. fjórar vikur en ekki sex; þó skal ekki breyta tímalengd skammtastærðarrannsóknarinnar,
- í ljósi þess hvað ungvíði ormanna er smátt er eindregið mælt með notkun litunaraðferðarinnar við talningu,
- gildisviðmiðuninni sem varðar fjölda ungvíðis á hvert prófunarlát í samanburðarhópnum skal breyta í 50.

HEIMILDIR

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

6. viðbætur

Ítarleg lýsing á útdráttartækni

Litun með Bengal-rauðu

Þessi aðferð, sem var upphaflega þróuð í vatnavistfræði (1. heimild), var fyrst lögð til í því skyni að telja ungvíði pottorma í æxlunarprófun W. de Coen (Háskólinn í Ghent, Belgíu). á *Enchytraeidae*. Óháð því þróaði RIVM Bilthoven (2.–3. heimild) breytta útgáfu (Bengal-rautt blandað með formaldehýði í stað etanóls).

Við lok endanlegar prófunar (þ.e. eftir sex vikur) er jarðvegurinn í prófunarílátunum fluttur yfir í grunnt ílát. Bellaplast-ílát eða framköllunarbakki með riffluðum botni er hentugt í þessu skyni, það síðarnefnda vegna þess að rifflurnar takmarka hreyfingar ormannanna innan athugunarsvæðisins. Ungvíðið er fest (e. *fixed*) með etanóli (u.þ.b. 5 ml á hverja samhliða prófun). Síðan eru ílátin fyllt með 1 til 2 cm vatnslagi. Nokkrum dropum (200 til 300 µl) af Bengal-rauðu (1% lausn í etanóli) er bætt við (annar valkostur er 0,5% eósin) og efnisþáttunum tveimur blandað vandlega saman. Eftir 12 klst. ættu ormarnir að vera rauðleitir og auðvelt að telja þá því þeir koma til með að liggja á yfirborði undirlagsins. Að öðrum kosti er hægt að skola undirlagið/alkóhólblönduna af gegnum sigti (möskvastærð: 0,250 mm) áður en ormarnir eru taldir. Með því að nota þessa aðferð skolest kaólínít, mór og eitthvað af sandinum burtu og það verður auðveldara að sjá og telja rauðleitu ormana. Notkun á linsum með ljósi (linsustærð a.m.k. 100 × 75 mm með stækkunarstuðli 2 til 3) mun einnig auðvelda talningu.

Litunartæknin stýttir talningartímann niður í nokkrar mínútur á hvert ílát og sem viðmiðun ætti að vera mögulegt fyrir eina manneskju að meta öll ílát í einni prófun á tveimur dögum hið mesta.

Votúdráttur

Hefja skal votúdrátt um leið og prófun lýkur. Jarðvegur úr hverju prófunarílati er settur í plastsigti með u.þ.b. 1 mm möskvastærð. Sigtin eru síðan hengd í plastskálar án þess að þau snerti botninn. Skálarnar eru fylltar varlega með vatni þar til sýnin í sigtunum eru algerlega undir vatnsyfirborðinu. Til að tryggja að endurheimtarhlutfall ormannanna sem eru til staðar verði hærra en 90% skal útdráttartímabilið vera 3 dagar við 20 ± 2 °C. Við lok útdráttartímabilsins eru sigtín fjarlægð og vatninu helld rólega af (að undanskildu litlu magni) og þess gætt að hrófla ekki við setinu á botni skálanna. Plastskálarnar eru síðan hristar lítillega til að þyrlla setinu upp í vatninu fyrir ofan það. Vatnið er fært í petriskál og eftir að jarðvegsagnirnar hafa sest er hægt að finna pottormana, fjarlægja þá og telja með víðsjá og mjúkri töng úr stáli.

Fleyting

Aðferð, sem byggir á fleytingu, hefur verið lýst í athugasemd frá R. Kuperman (4. heimild). Eftir að innihald prófunaríláts hefur verið fest með etanóli er Ludox (AM-30 kísl sem myndar sviflausn, 30% af þyngd, sviflausn í vatni) látið fljóta yfir jarðveginn, allt að 10 til 15 mm yfir yfirborði jarðvegsins. Eftir að jarðveginum og fleytingarefninu hefur verið vandlega blandað saman í 2–3 mínútur er auðvelt að telja ormaungvíði sem flýtur á yfirborðinu.

HEIMILDIR

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

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

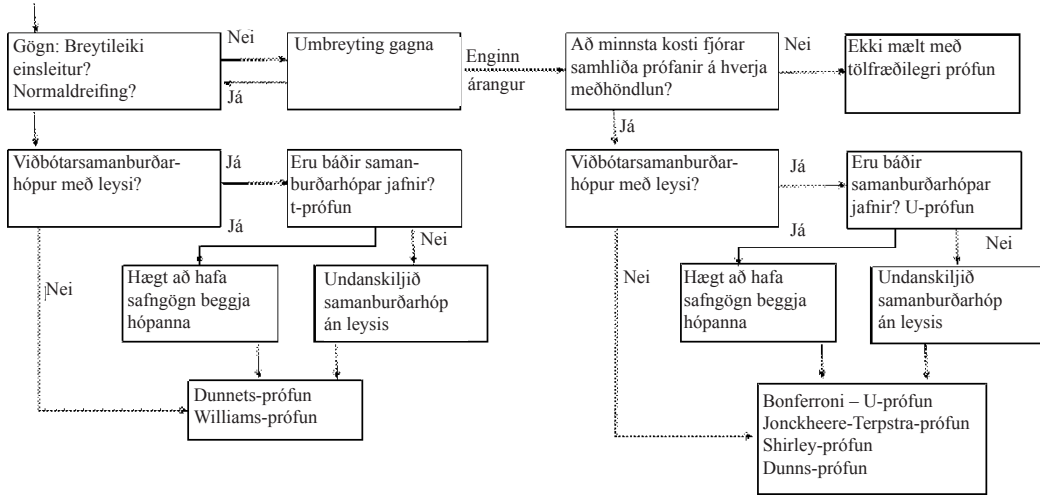
7. viðbætur

Yfirlit yfir tölfraðilegt mat á gögnum (ákvörðun á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif)

Stikabundin próf

Óstikabundin próf

Upphaf



C.33. ÆXLUNARPRÓFUN Á ÁNAMÖÐKUM (EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI)

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 222 um prófanir (2004). Hún er ætluð til notkunar við að meta áhrif íðefna í jarðvegi á viðkomu (og aðra nær banvæna endapunkta) ánamaðkategundarinnar *Eisenia fetida* (Savigny 1826) eða *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1.–2. heimild). Prófunin hefur verið hringprófuð (3. heimild). Til er prófunaraðferð til að prófa bráð eiturrif á ánamaðka (4. heimild). Fjöldi annarra alþjóðlegra og landsbundinna viðmiðunarreglna um prófanir á bráðum og langvinnnum eiturrifum á ánamaðka hefur verið birtur (5.–8. heimild).
2. Talið er að *Eisenia fetida* /*Eisenia andrei* séu dæmigerðar tegundir jarðvegslífvera og einkum ánamaðka. Bakgrunnsupplýsingar um vistfræði ánamaðka og notkun þeirra í vísitæturefnafræðilegum prófunum eru fáanlegar (7. og 9.–12. heimild).

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

3. Fullvaxnir ormar eru látnir verða fyrir váhrifum af röð styrkleika af prófunariðefni sem er annað hvort blandað í jarðveginn eða, ef um er að ræða varnarefni, sett í eða á jarðveginn samkvæmt verkferlum sem svara til notkunarmynsturs íðefnisins. Ísetningaraðferðin er sértæk m.t.t. tilgangs prófunarinnar. Röð prófunarstyrkleika er valin þannig að hún nái yfir þá styrkleika sem líklegt er að valdi bæði nær banvænum áhrifum og banvænum áhrifum á átta vikna tímabili. Dánartíðni og vaxtaráhrif á fullvöxnu ormana eru ákvörðuð eftir váhrif í 4 vikur. Fullvöxnu dýrin eru síðan fjarlægð úr jarðveginum og áhrif á æxlun metin eftir 4 vikur í viðbót með því að telja fjölda afkvæma í jarðveginum. Viðkoma ormana sem verða fyrir váhrifum af prófunariðefninu er borin saman við viðkomu samanburðarhópanna til að ákvarða i) styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) og/eða ii) EC_x (t.d. EC_{10} , EC_{50}) með því að nota aðhvarfslíkan til að meta styrkinn sem veldur x% minnkun í viðkomu. EC_x skal liggja innan styrkleikanna í prófuninni (t.d. EC_{10} , EC_{50}) þannig að EC_x fái við innreikning frekar en framreikning (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti).

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

4. Eftirfarandi upplýsingar sem varða prófunariðefnið skulu liggja fyrir til aðstoðar við hönnun á viðeigandi prófunaraðferðum:
 - vatnsleysni,
 - $\log K_{ow}$,
 - gufuþrýstingur,
 - og upplýsingar um afdrif og hegðun í umhverfinu, ef unnt er, (t.d. hraði ljósrofs og hraði vatnsrofs þar sem það skiptir máli fyrir notkunarmynstrin).
5. Þessi prófunaraðferð á við fyrir öll íðefni óháð vatnsleysni þeirra. Prófunaraðferðin á ekki við fyrir rokgjörn íðefni, skilgreind hér sem íðefni þar sem fasti samkvæmt Henry og/eða deilistuðull loft/vatns er hærrí einn, eða íðefni með gufuþrýsting yfir 0,0133 Pa við 25 °C.
6. Í þessari prófunaraðferð er ekki tekið tillit til hugsanlegs niðurbrots prófunariðefnisins á prófunartímabilinu. Af þessum sökum er ekki hægt að ganga út frá því að váhrifastyrkur haldist við upphafleg gildi í allri prófuninni. Mælt er með efnagreiningu á prófunariðefninu við upphaf og lok prófunarinnar í þessu tilviki.

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

7. Ákvarða þarf styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) og EC_x fyrir viðmiðunariðefni til að veita fullvissu fyrir því að prófunarskilyrðin á rannsóknarstofunni séu fullnægjandi og til að sannreyna að svörun prófunarlífveranna hafi ekki tekið tölfraðilegum breytingum með tímanum. Mælt er með því að prófa viðmiðunariðefni a.m.k. einu sinni á ári eða, ef prófanir eru gerðar sjaldnar, samhliða ákvörðun á eiturrifum prófunariðefnis. Karbendasím eða benómýl eru viðeigandi viðmiðunariðefni sem sýnt hefur verið fram á að hafi áhrif á æxlun (3. heimild). Marktæk áhrif ættu að koma fram á bilinu a) 1 og 5 mg virkt innihaldsefni/kg þurrmassa eða b) 250–500 g/ha eða 25–50 mg/m². Ef jákvæður eiturefnastaðall er hafður með í prófanaröðinni er notaður einn styrkleiki og fjöldi samanburðarhópa skal vera sá sami og fjöldi samhliða prófana.

GILDI PRÓFUNARINNAR

8. Eftirfarandi viðmiðanir skulu uppfylltar í samanburðarhópnum til að niðurstöður úr prófun teljist gildar:
 - hver samhliða prófun (með 10 fullvöxnum dýrum) hefur gefið af sér ≥ 30 ungvíði við lok prófunarinnar,
 - frávíksstuðull æxlunar er $\leq 30\%$,
 - dánartíðni fullvaxinna dýra fyrstu 4 vikur prófunarinnar er $\leq 10\%$.

Ef prófun uppfyllir ekki ofangreindar gildisviðmiðanir skal stöðva prófunina nema hægt sé að leggja fram rök fyrir því að halda prófuninni áfram. Rökstuðningurinn skal koma fram í skýrslunni.

LÝSING Á PRÓFUNINNI

Búnaður

9. Nota skal prófunarlát úr gleri, sem taka u.þ.b. einn til tvo lítra, eða úr öðru efnafræðilega óvirku efni. Þversniðsflatarmál ílátanna skal vera u.þ.b. 200 cm² þannig að u.þ.b. 5–6 cm djúpt rakt undirlag náist þegar 500 til 600 g þurrmassa undirstöðuefnis er bætt við. Lok ílátsins skal vera þannig gert að loftskipti milli undirlagsins og andrúmsloftsins náist og hleypa birtu inn (t.d. með götuðu gagnsæju loki) en um leið koma í veg fyrir að ormarnir sleppi út. Ef magn prófunarundirlags sem er notað er langt yfir 500 til 600 g í hverju prófunarláti skal auka ormafjöldann í hlutfalli við það.
10. Nota þarf venjulegan rannsóknarstofubúnað, einkum eftirfarandi:
 - þurrskáp,
 - viðsjá,
 - sýrustigsmæli og ljósmæli,
 - hentugar, nákvæmar vogir,
 - fullnægjandi búnað til hitastýringar,
 - fullnægjandi búnað til rakastjórnunar (ekki nauðsynlegt ef váhrifalátin eru með lok),
 - ræktunarkassa eða lítið herbergi með loftræstingu,
 - tangir, króka eða lykkjur,
 - vatnsbáð.

Tilreiðsla á tilbúna jarðveginum

11. Í þessari prófun er notaður tilbúinn jarðvegur (5. og 7. heimild) sem hefur eftirfarandi samsetningu (byggt á þurrvigt, þurrkað í stöðuga þyngd við 105 °C):
 - 10% mosamór (eins nærri pH-gildinu 5,5 til 6,0 og mögulegt er, án sýnilegra plöntuleifa, finmulinn, þurrkaður í mælt rakainnihald),
 - 20% kaólinleir (kaóliníttinnihald helst yfir 30%),

- 0,3 til 1,0% kalsíumkarbónat (CaCO_3 , malað í duft, greiningarhreinleiki) til að ná upphaflegu pH-gildi sem nemur $6,0 \pm 0,5$,
- 70% loftþurrkaður kvarssandur (fer eftir magni kalsíumkarbónats sem þörf er á), aðallega finn sandur þar sem yfir 50% af ögnunum eru á bilinu 50 til 200 míkron.

1. *athugasemd*: Magn kalsíumkarbónats sem þörf er á ræðst af efnisþáttum jarðvegsundirlagsins, þ.m.t. fóður, og skal ákvarðað með mælingum á jarðvegsundirsýnum rétt fyrir prófunina. Sýrustig er mælt í blönduðu sýni í 1 M lausn af kalíumklóríði (KCl) eða 0,01 M lausn af kalsíumklóríði (CaCl_2) (13).

2. *athugasemd*: Minnka má lífrænt kolefnisinnihald tilbúna jarðvegsins, t.d. með því að minnka móinnihaldið í 4–5% og auka sandinnihaldið til samræmis við það. Með því að draga svona úr lífrænu kolefnisinnihaldi gætu möguleikar á ásoði prófunariðfnisins á jarðveginn (lífrænt kolefni) minnkað og aðgengileiki prófunariðfnisins fyrir ormana gæti aukist. Sýnt hefur verið fram á að *Eisenia fetida* getur uppfyllt gildisviðmiðanir um æxlu við prófanir í jarðvegi sem inniheldur minna af lífrænu kolefni, t.d. 2,7% (14. heimild), og reynslan hefur sýnt að þessu sé einnig unnt að ná í tilbúnum jarðvegi með 5% mó. Áður en slikur jarðvegur er notaður í endanlegri prófun er því ekki nauðsynlegt að sýna fram á hentugleika tilbúna jarðvegsins til að prófunin verði í samræmi við gildisviðmiðanir nema móinnihaldið sé minnkað meira en tilgreint er hér að framan.

3. *athugasemd*: Þegar náttúrulegur jarðvegur er notaður í viðbótarprófun (t.d. efra aðferðarþrepi) skal einnig sýna fram á hentugleika jarðvegsins og að gildisviðmiðanir prófunarinnar náist.

12. Þurrinnihaldsefnum jarðvegsins er blandað vel saman (t.d. í stórum rannsóknarstofublandara) á vel loftræstum stað. Áður en prófun hefst er þurr, tilbúinn jarðvegur rakabættur með því að bæta við hann nægilega miklu af afjónuðu vatni til að ná u.þ.b. helmingnum af endanlegu vatnsinnihaldi, sem er 40 til 60% af hámarksvatnsheldni (svarar til þurrmassa með $50 \pm 10\%$ rakainnihald. Þetta gefur undirlag sem hvorki stendur vatn í né rennur úr þegar það er þjappað saman í hendinni. Hámarksvatnsheldni tilbúna jarðvegsins er ákvörðuð í samræmi við verkferlana sem er lýst í 2. viðbæti, ISO 11274 (15. heimild) eða jafngildum ESB-staðli.
13. Ef prófunariðefnið er borið á jarðvegsyfirborð eða blandað í jarðveg án vatns er hægt að blanda endanlegu vatnsmagni í tilbúna jarðveginn við tilreiðslu jarðvegarins. Ef prófunariðefninu er blandað í jarðveginn ásamt vatni er hægt að bæta viðbótarvatni við ásamt prófunariðefninu (sjá 19. lið).
14. Rakainnihald jarðvegs er ákvarðað við upphaf og lok prófunar í samræmi við ISO 11465 (16. heimild) eða jafngildan ESB-staðal og sýrustig jarðvegs í samræmi við 3. viðbæti eða ISO 10390 (13. heimild) eða jafngildan ESB-staðal. Þessar ákvarðanir skulu gerðar á sýni af viðmiðunarjarðvegi og sýni af jarðvegi með hverjum prófunarstyrk. Ekki skal stilla sýrustig jarðvegs þegar súr eða basísk íðefni eru prófuð. Fylgjast skal með rakainnihaldinu í allri prófuninni með því að vigta ílátin reglubundið (sjá 26. og 30. lið).

Val á prófunardýrum og undirbúningur þeirra

15. Tegundirnar sem eru notaðar í prófuninni eru *Eisenia fetida* eða *Eisenia andrei* (1.–2. heimild). Til að hefja prófunina þarf að nota fullvaxna orma á bilinu tveggja mánaða til eins árs gamla og með gjörð. Velja skal ormana úr samstilltri ræktun með tiltölulega einsleitri aldursdreifingu (4. viðbæti). Aldursmunur á einstaklingum í prófunarhóp skal ekki vera meiri en 4 vikur.
16. Ormarnir sem eru valdir skulu aðlagðir sömu tegund af tilbúnu jarðvegsundirlagi og á að nota í prófuninni í a.m.k. einn dag. Á þessu tímabili skal gefa ormunum sama fóður og notað verður í prófuninni (sjá 31. til 33. lið).
17. Vega skal hópa með 10 ornum, hvern fyrir sig, og setja hópana af handahófi í prófunarlátin við upphaf prófunarinnar. Ormarnir eru skolaðir fyrir vigtnu (með afjónuðu vatni) og umframvatn fjarlæggt með því að setja ormana á síupappír í örskamma stund. Blautþyngd einstakra orma skal vera á bilinu 250 til 600 mg.

Undirbúningur prófunarstyrkleikanna

18. Hægt er að nota tvær aðferðir við ísetningu prófunariðfnisins: blanda prófunariðfninu í jarðveginn (sjá 19.–21. lið) eða bera það á jarðvegsyfirborðið (sjá 22.–24. lið). Val á viðeigandi aðferð fer eftir tilganginum með prófuninni. Almennt séð er mælt með því að blanda prófunariðfninu í jarðveginn. Þó getur reynst þörf á að nota aðferðir við ísetningu sem eru í samræmi við viðteknar jarðræktaraðferðir (t.d. að úða fljótandi samsetningu eða nota sérstakar varnarefnasamsetningar, s.s. korn eða fræmeðhöndlun). Leysar, sem eru notaðir sem hjálparefni við meðhöndlun jarðvegs með prófunariðfni, skulu valdir á grundvelli lítilla eiturhrifa þeirra á ánamaðka og hafa þarf viðeigandi samburðarhóp með leysi í prófunartilhöguninni (sjá 27. lið).

Blöndun prófunariðfnis í jarðveginn

Prófunariðfni sem er leysanlegt í vatni

19. Lausn prófunariðfnisins í afjónuðu vatni er tilreidd rétt áður en prófunin hefst í magni sem nægir fyrir allar samhlíða prófanir með einum prófunarstyrk. Meðleysisir getur reynst nauðsynlegur til að auðvelda tilreiðslu prófunarlausanarinnar. Hentugt er að tilreiða magn lausnar sem er nauðsynlegt til að ná endanlegu rakainnihaldi (40 til 60% af hámarksvatnsheldni). Lausninni er blandað vandlega við jarðvegsundirlagið áður en hún er sett í prófunarlátíð.

Prófunariðfni sem er óleysanlegt í vatni

20. Prófunariðfnið er leyst upp í litlu magni af heppilegum lífrænum leysi (t.d. asetoni) og síðan údað á eða blandað í lítið magn af finum kvarssandi. Leysirinn er síðan fjarlægður með uppgufun í súgskáp í a.m.k. nokkrar mínútur. Meðhöndluðum sandi er síðan blandað vandlega saman við forrakabættan, tilbúinn jarðveg. Síðan er afjónuðu vatni bætt við (í nauðsynlegu magni) og blandað saman við til að ná endanlegu rakainnihaldi sem nemur 40 til 60% af hámarksvatnsheldni. Þá er jarðvegurinn tilbúinn til ísetningar í prófunarlátin. Þess skal gætt að tilteknir leysar geta verið eitradir fyrir ánamaðka.

Prófunariðfni sem er óleysanlegt í vatni og lífrænum leysum

21. Blanda, samsett úr 10 g af finmöluðum iðnaðarkvarssandi og því magni af prófunariðfni sem þörf er á til að ná prófunarstyrknum í jarðveginum, er tilreidd. Blöndunni er síðan blandað vandlega saman við forrakabættan, tilbúinn jarðveg. Síðan er afjónuðu vatni bætt við í nauðsynlegu magni til að ná endanlegu rakainnihaldi sem nemur 40 til 60% af hámarksvatnsheldni og því blandað við. Þá er jarðvegurinn tilbúinn til ísetningar í prófunarlátin.

Prófunariðfnið borið á jarðvegsyfirborðið

22. Jarðvegurinn er meðhöndlaður eftir að ormarnir eru settir í hann. Fyrst eru prófunarlátin fyllt með röku jarðvegsundirlagi og vigtaðir ormar settir á yfirborðið. Heilbrigðir ormar grafa sig yfirleitt strax niður í undirlagið og af því leiðir að ef einhverjir eru eftir á yfirborðinu eftir 15 mínútur eru þeir skilgreindir sem skaddaðir og skal skipt út. Ef ormunum er skipt út skal vigta þá nýju og þá sem skipt er út til að heildarlífþyngd ormahóps sem verður fyrir váhrifum og heildarþyngd ílátsins með ormunum við upphaf prófunarinnar sé þekkt.
23. Prófunariðfnið er sett í. Ekki skal setja það í jarðveginn fyrr en hálf tíma eftir að ormarnir eru settir í hann (eða ef ormar eru á jarðvegsyfirborðinu) til að forðast bein váhrif frá prófunariðfninu með snertingu við húð. Ef prófunariðfnið er varnarefni getur verið við hæfi að úða því á jarðvegsyfirborðið. Bera skal prófunariðfnið eins jafnt og unnt er á jarðvegsyfirborðið með því að nota hentugt úðunartæki af rannsóknarstofustærð til að líkja eftir úðun á akri. Fjarlægja skal lokið af prófunarlátinu fyrir ísetningu og setja hlíf í staðinn sem ver hliðar ílátsins fyrir úðanum. Hlífina er hægt að gera úr prófunarláti sem búið er að fjarlægja botninn af. Ísetningin skal fara fram við hitastig sem nemur 20 ± 2 °C og, að því er varðar vatnslausnir, ýrulausnir eða dreifilausnir, með vatnissetningarhraða á bilinu 600 til 800 $\mu\text{l}/\text{m}^2$. Hraðinn skal sannprófaður með viðeigandi kvörðunartækni. Nota skal sérstakar samsetningar, s.s. korn eða fræmeðhöndlun, í samræmi við notkun í landbúnaði.

24. Skilja skal prófunarilát eftir opin í eina klukkustund til að allir rokgjarnir leysar, sem tengjast notkun prófunaríðefnisins, geti gufað upp. Þess skal gætt að engir ormar sleppi úr prófunarilátinu á þessu tímabili.

AÐFERÐ

Prófunar- og samanburðarhópar

25. Mælt er með fjölda sem nemur 10 ánamöðkum í 500–600 g þurrmassa af tilbúnum jarðvegi (þ.e. 50–60 g af jarðvegi á hvern orm). Ef notað er meira magn af jarðvegi, eins og getur komið til við prófun á varnarefnum með sérstaka notkunaraðferð, s.s. fræmedhöndlun, skal halda magninu 50–60 g af jarðvegi á hvern orm með því að fjölga ormunum. Tíu ormar eru undirbúnir fyrir hvert samanburðar- og meðhöndlunarilát. Ormarnir eru skolaðir með vatni og þerraðir og síðan settir á ídrægan pappír í stuttan tíma til að umframvatn geti runnið af þeim.
26. Til að koma í veg fyrir kerfisbundnar villur við dreifingu ormana í prófunarilátin skal ákvarða einsleitni prófunarþýðisins með því að vigta 20 orma hvern fyrir sig sem teknir eru af handahófi úr þýðinu sem taka á prófunarormana úr. Þegar einsleitni hefur verið tryggð eru ormahópar valdir úr, vegnar og settar í prófunarilát með slembirðunaraðferð. Eftir að prófunarormunum hefur verið bætt í skal vigta hvert prófunarilát til að tryggja að til verði upphafsþyngd sem hægt er að nota sem grundvöll til að fylgjast með rakainnihaldi jarðvegs í allri prófuninni eins og lýst er í 30. lið. Síðan er prófunarilátunum lokað eins og lýst er í 9. lið og þeim komið fyrir í prófunarklefa.
27. Viðeigandi samanburðarhópar eru tilreiddir fyrir hverja aðferð við ísetningu prófunaríðefnis sem lýst er í 18. til 24. lið. Viðeigandi aðferðum, sem er lýst, er fylgt við tilreiðslu samanburðarhópana að því undanskildu að prófunaríðefninu er ekki bætt í. Þannig er lífrænum leysum, kvarssandi eða öðrum burðarefnum, eftir því sem við á, bætt í samanburðarhópana í styrk/magni sem svarar til þess sem notað er í meðhöndlunarhópunum. Ef leysir eða annað burðarefni er notað til að setja prófunaríðefnið í skal einnig tilreiða og prófa viðbótarsamanburðarhóp án burðarefnisins eða prófunaríðefnisins til að tryggja að burðarefnið hafi engin áhrif á niðurstöðuna.

Prófunarskilyrði

28. Prófunarhitastigið er 20 ± 2 °C. Prófunin er framkvæmd við stýrða birtu- og myrkvunarhringrás (helst 16 klst birta og 8 klst myrkur) og lýsingu sem nemur 400 til 800 lúxum hjá prófunarilátunum.
29. Lofti er ekki bætt í prófunarilátin meðan á prófuninni stendur en hönnun prófunarilátalokanna ætti að gefa færi á loftskiptum en takmarka um leið uppgufun raka (sjá 9. lið).
30. Vatnsinnihaldi jarðvegsundirlagsins í prófunarilátunum er viðhaldið meðan á prófuninni stendur með reglubundinni vigtnun á prófunarilátunum (án loka). Tap er bætt upp, eftir því sem nauðsyn krefur, með afjönuðu vatni. Vatnsinnihaldið skal ekki sveiflast meira en 10% frá vatnsinnihaldinu við upphaf prófunarinnar.

Fóðrun

31. Allt fóður telst viðunandi ef það er af gæðum sem hafa reynt henta til að viðhalda a.m.k. þyngd ormana meðan á prófuninni stendur. Reynslan hefur sýnt að haframjöl, kúaskítur eða hrossatað er hentugt fóður. Gera skal athugun til að tryggja að kýrnar eða hestarnir, sem húsdýraáburðurinn er fenginn úr, fái ekki lyf eða séu meðhöndluð með efnum, s.s. vaxtarhövötum, þráðormaeitri eða svipuðum dýralyfjum, sem gætu haft skaðleg áhrif á ormana meðan á prófuninni stendur. Mælt er með að kúaskítum sé safnað sérstaklega því reynslan hefur sýnt að kúaskítur, sem er tiltækur á markaði og notaður sem garðáburður, getur haft skaðleg áhrif á ormana. Húsdýraáburðurinn skal loftþurrkaður, finmalaður og gerilsneyddur fyrir notkun.
32. Fóðra skal ræktun af ornum sem eru ekki í prófun á hverri nýrri fóðurlotu áður en hún er notuð í prófun, til að tryggja að hún sé af hentugum gæðum. Vöxtur og eggghylkjaframleiðsla skal ekki vera minni en hjá ornum sem haldið er í undirlagi sem inniheldur ekki nýju fóðurlotuna (skilyrði eins og lýst er í prófunaraðferð C.8 (4. heimild)).

33. Fóður er fyrst gefið einum degi eftir að ormarnir og prófunariðefnið eru sett í jarðveginn. Um það bil 5 g af fóðri er dreift á jarðvegsyfirborðið í hverju íláti og vætt með afjónuðu vatni (u.þ.b. 5 til 6 ml í hvert ílát). Eftir það er fóðrað einu sinni í viku á fjögurra vikna prófunartímabilinu. Ef fóður er ekki étið skal minnka skammtinn til að komast hjá sveppavexti eða myglu. Fullvaxin dýr eru tekin úr jarðveginum á 28. degi prófunarinnar. Síðan er 5 g af fóðri til viðbótar sett í hvert prófunarílát. Frekari fóðrun á sér ekki stað þær 4 vikur sem eftir eru af prófuninni.

Val á prófunarstyrkleikum

34. Fyrirliggjandi þekking á eiturhrifum prófunariðefnis ætti að koma að gagni við val á hæfilegum prófunarstyrkleika, t.d. úr rannsóknum á bráðum eiturhrifum (4. heimild) og/eða skammtastærðarrannsóknum. Ef nauðsyn krefur er framkvæmd skammtastærðarrannsókn, t.d. með fimm prófunarstyrkleikum sem nema 0,1, 1,0, 10, 100 og 1000 mg/kg (þurrmassi jarðvegs). Ein samhliða prófun nægir fyrir hvern meðhöndlunarhóp og samanburðarhóp. Tímalengd skammtastærðarrannsóknarinnar er tvær vikur og dánartíðni er metin við lok prófunarinnar.

Tilhögun tilraunar

35. Í þessari prófunaraðferð gerð krafa um ákvörðun á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif og EC_x þar eð ekki er hægt að mæla fyrir um eina samantekt tölfraðilegra upplýsinga um prófunina. Líklegt er að í fyrirsjáanlegri framtíð geri eftirlitsyfirvöld kröfu um styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif. Útbreiddari notkun á EC_x , út frá tölfraðilegum og vistfræðilegum forsendum, kann að verða samþykkt í nánustu framtíð. Þess vegna er þrenns konar tilhögun lögð til á grundvelli ráðlegginga sem leiða af hringprófun á æxlunarprófun á pottormum (17. heimild).
36. Við ákvörðun á styrksviði skal hafa eftirfarandi í huga:

- Til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif skal prófa a.m.k. fimm/tölf styrkleika í jafnhlutfallaröð. Mælt er með fjórum samhliða prófunum fyrir hvern prófunarstyrk ásamt átta samanburðarhópum. Munurinn á styrkleikum skal nema stuðli sem fer ekki yfir 2,0.
- Til að ákvarða EC_x (t.d. EC_{10} , EC_{50}) er mælt með fullnægjandi fjölda styrkleika til að fá fram a.m.k. fjórar mismunandi, tölfraðilega mikilvægar meðalsvaranir við þennan styrk. Mælt er með a.m.k. tveimur samhliða prófunum fyrir hvern prófunarstyrk og sex samhliða samanburðarprófunum. Bilstuðullinn getur verið breytilegur, þ.e. minni en eða jafn og 1,8 á því bili sem búist er við að áhrif komi fram og yfir 1,8 við meiri og minni styrk.
- Samsett aðferð gerir það kleift að ákvarða bæði styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif og EC_x . Nota skal átta meðhöndlunarstyrkleika í jafnhlutfallaröð. Mælt er með fjórum samhliða prófunum fyrir hvern meðhöndlunarhóp ásamt átta samanburðarhópum. Munurinn á styrkleikum skal nema stuðli sem fer ekki yfir 1,8.

Lengd prófunar og mælingar

37. Á 28. degi eru lifandi fullvaxnir ormar skoðaðir og taldir. Allt óeðlilegt atferli (t.d. getur ekki grafið sig niður í jarðveginn, liggur hreyfingarlaus) og á formi og byggingu (t.d. opin sár) eru skráð. Síðan eru allir fullvaxnir ormar fjarlægðir úr prófunarílátunum og taldir og vigtaðir. Það getur auðveldað leitina að fullvöxnum ornum ef jarðvegurinn með þeim í er fluttur í hreinan bakka fyrir matið. Skola skal orma, sem eru teknir úr jarðveginum, fyrir vigtnu (með afjónuðu vatni) og fjarlægja umframvatn með því að setja ormana á siupappír í örskamma stund. Orma sem ekki finnast á þessum tímavæðingum skal skrá sem dauða þar eð hægt er að gera ráð fyrir að þeir hafi drepist og rotnað áður en matið er framkvæmt.
38. Ef jarðvegurinn var tekinn úr ílátunum er hann settur í þau aftur (án fullvöxnu ormana en með öllum egghylkjum sem hafa orðið til). Síðan er jarðvegurinn ræktaður í fjórar vikur í viðbót við sömu prófunarskilyrði að því undanskildu að einungis er fóðrað einu sinni, við upphaf þessa prófunaráfanga (sjá 33. lið).

39. Við lok seinna fjögurra vikna tímabilsins er fjöldi ungvíðis, sem skríður úr egghylkjunum í prófunarjarðveginum, og fjöldi egghylkja talinn með aðferðunum sem lýst er í 5. viðbæti. Einnig skal skrá öll ummerki um meiðsli eða skaða á ormunum meðan prófunartímabilið stendur yfir.

Markprófun

40. Ef engin áhrif eru merkjanleg við hæsta styrk í skammtastærðarrannsókninni (t.d. 1000 mg/kg) er æxlunarprófunin framkvæmd sem markprófun og notaður prófunarstyrkur sem nemur 1000 mg/kg. Markprófun gefur færi á að sýna fram á að styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif á æxlun er hærrí en styrkleikamörkin en lágmarkar um leið fjölda orma, sem er notaður í prófuninni. Nota skal átta samhliða prófanir, bæði fyrir meðhöndlaða jarðveginn og samanburðinn.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

41. Þó að yfirlit sé gefið í 6. viðbæti eru engar endanlegar tölfræðilegar leiðbeiningar um greiningu á prófunarniðurstöðum gefnar í þessari prófunaraðferð.
42. Annar endapunkturinn er dánartíðni. Þó skal einnig skrá breytingar á atferli (t.d. getur ekki grafið sig niður í jarðveginn, liggur hreyfingarlaus við glerhlið prófunarilátsins) og á formi og byggingu (t.d. opin sár) fullvaxinna orma sem og hvort ungvíði er til staðar. Almennt skal nota probit-greiningu (18. heimild) eða tvíkosta aðhvarfsgreiningu til að ákvarða LC_{50} . Í tilvikum þar sem þessi greiningaraðferð hentar ekki (t.d. ef færri en þrjú styrkleikar með einhverri dánartíðni eru fyrir hendi) er þó hægt að nota staðgönguaðferðir. Meðal þessara aðferða gætu verið hlaupandi meðaltal (19. heimild), klippt Spearman-Kärber-aðferð (20. heimild) eða einfaldur innreikningur (t.d. faldmeðaltal LC_0 og LC_{100} , eins og það er reiknað með því að margfalda kvaðratrótina af LC_0 með LC_{100}).
43. Hinn endapunkturinn er frjósemi (þ.e. fjöldi ungvíðis sem verður til). Rétt eins og í skammtastærðarrannsókninni ætti þó að skrá öll skaðleg einkenni í lokaskýrslunni. Í tölfræðilegri greiningu þarf meðaltal \bar{x} og staðalfrávik fyrir hvern meðhöndlunarhóp og hvern samanburðarhóp til að reikna út æxlun.
44. Ef gerð hefur verið dreifnigreining er hægt að skipta staðalfrávikum, s , og frítölu, df , út fyrir safnað dreifnimat, sem fæst með dreifnigreiningunni, og fyrir frítölur þess, eftir því sem við á, að því tilskildu að dreifnin sé ekki háð styrknum. Í því tilviki er notuð stök dreifni í samanburðarhóp og meðhöndlunarhóp. Þessi gildi eru yfirleitt reiknuð með tölfræðihugbúnaði, sem hægt er að kaupa, og niðurstöður úr hverju íláti eru notaðar sem samhliða prófanir. Ef það virðist skynsamlegra að nota safngögn úr neikvæðum samanburðarhópum og samanburðarhópum með leysi en að gera prófun á þeim sitt í hvoru lagi ætti að staðfesta með prófun að á þeim sé ekki marktækur munur (að því er varðar viðeigandi prófanir sjá 47. lið og 6. viðbæti).
45. Frekari tölfræðilegar prófanir og ályktanir fara eftir því hvort gildi í samhliða prófunum eru normaldreifð og einsleit að því er varðar dreifni þeirra.

Mat á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif

46. Notkun á öflugum prófunum er ákjósanlegust. Nota skal upplýsingar, t.d. um fyrri reynslu af hringprófunum eða önnur rannsóknarsöguleg gögn, um það hvort gögn séu hér um bil normaldreifð. Einsleitni í dreifni (einsdreifni) er mikilvægari. Reynslan sýnir að dreifnin eykst oft með hækkandi meðaltali. Í þessum tilvikum gæti gagnavörpun leitt til einsdreifni. Slík umbreyting skal þó byggjast á reynslu af rannsóknarsögulegum gögnum fremur en gögnum sem verið er að rannsaka. Þegar um er að ræða einsleit gögn skal framkvæma margar t-prófanir, s.s. Williams-prófun ($\alpha = 0,05$, einhliða) (21.–22. heimild) eða, í tilteknum tilvikum, Dunnetts-prófun (23.–24. heimild). Hafa skal í huga að ef um er að ræða ójafna endurtekningu verður að leiðrétta t-gildin í töflunni, samanber Dunnett og Williams. Í sumum tilvikum eykst/minnkar svörnin ekki reglubundið vegna þess að dreifingin er mikil. Ef um er að ræða mikil frávik frá einhalla á Dunnetts-prófunin betur við. Ef um er að ræða frávik frá einsdreifni kann að vera skynsamlegt að rannsaka nánar hugsanleg áhrif

á dreifni til að ákvarða hvort hægt er að nota t-prófanirnar án þess að glata miklum styrk (25. heimild). Að öðrum kosti er hægt að nota margfalda U-prófun, t.d. Bonferroni-U-prófunina samkvæmt Holm (26. heimild) eða, ef þessi gögn sýna misdreifni en eru að öðru leyti í samræmi við undirliggjandi einhalla skammtasvör, annað óstikabundið próf (t.d. Jonckheere-Terpstra, 27.–28. heimild, eða Shirley, 29.–30. heimild) og væri alla jafna ákjósanlega en t-prófanir með ójafnri dreifni. (sjá einnig lýsinguna í 6. viðbæti).

47. Ef markprófun hefur verið framkvæmd og forsendur stikabundinna prófunaraðferða (normleiki, einsleitni) eru uppfylltar er hægt að nota paraða t-prófun eða að öðrum kosti Mann-Whitney-U-prófunaraðferðina (31. heimild).

Mat á EC_x

48. Við útreikning á öllum EC_x -gildum eru meðaltöl fyrir hvern meðhöndlunarhóp notuð í aðhvarfsgreiningu (línulega eða ólínulega) eftir að viðeigandi skammtasvörunarfall hefur fengist. Að því er varðar vöxt orma sem samfellda svörun er hægt að áætla EC_x -gildi með því að nota hentuga aðhvarfsgreiningu (32. heimild). Meðal heppilegra falla fyrir skammtabundin gögn (dánartíðni/lifun og fjöldi afkvæma sem verða til) eru venjuleg sigmoid-föll, tvíkosta föll eða Weibull-föll, sem innihalda tvær til fjórar breytur, en sum þeirra geta einnig líkt eftir tvífasa skammtasvörun. Ef skammtasvörunarfallið var aðlagð með línulegri aðhvarfsgreiningu ætti að finnast marktækur r^2 (ákvörðunarstuðull) og/eða hallatala með aðhvarfsgreiningunni áður en EC_x er metið með því að setja gildi, sem samsvarar $x\%$ af meðaltali samanburðarhópsins, inn í jöfnuna sem er fundin með aðhvarfsgreiningunni. 95% öryggismörk eru reiknuð út samkvæmt Fieller (vísun í Finney (18. heimild)) eða öðrum nútímalegum, viðeigandi aðferðum.
49. Að öðrum kosti er svörunin höfð sem hundradshlutfall eða hlutfall af líkanbreytu sem er túlkuð sem meðalsvörun samanburðarhópsins. Í þessum tilvikum er oft hægt að aðlaga venjulega (tvíkosta, Weibull-) sigmoid-ferilinn að niðurstöðunum með því að nota probit-aðhvarfsgreiningar (18. heimild). Í þessum tilvikum þarf að stilla þyngdarfallið fyrir mælanlegar svaranir, samkvæmt Christensen (33. heimild). Ef tvífasa hefur komið í ljós ætti þó tvíkostafall með fjórum breytum eða Weibull-fall, aðlagð með ólínulegri aðhvarfsgreiningu (34. heimild), að koma í stað probit-greiningar. Ef ekki er hægt að aðlaga heppilegt skammtasvörunarfall að gögnum er hægt að nota staðgönguáðferðir til að áætla EC_x og öryggismörk þess, s.s. hlaupandi meðaltal samkvæmt Thompson (19. heimild) og klippta Spearman-Kärber-aðferð (20. heimild).

PRÓFUNARSKÝRSLA

50. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunariðefni:

- tæmandi lýsing á prófunariðefninu, framleiðslulota, lota og CAS-númer, hreinleiki,
- eiginleikar prófunariðefnisins (t.d. log Kow, vatnsleysni, gufuþrýstingur, fasti samkvæmt Henry og upplýsingar um afdrif og hegðun).

Prófunarlifverur:

- tilraunadyr sem eru notuð: tegundir, vísindaheiti, uppruni lifvera og ræktunarskilyrði,
- aldur, stærðardreifing prófunarlifveranna (þyngd).

Prófunarskilyrði

- upplýsingar um tilreiðslu prófunarjarðvegsins,
- hámarksvatnsheldni jarðvegsins,
- lýsing á aðferðinni sem notuð var til að koma prófunariðefninu í jarðveginn,
- upplýsingar um hjálparefni sem eru notuð til að gefa prófunariðefnið,
- kvörðunarpplýsingar um úðunarbúnað, ef við á,
- lýsing á tilhögun tilraunar og verkferli,
- stærð prófunariláta og magn prófunarjarðvegs,
- prófunarskilyrði: ljósstyrkur, lengd birtu- og myrkvunarhringrásar, hitastig,

- lýsing á fœðrunarfyrirkomulaginu, tegund og magn fœðurs sem notað er í prófuninni, fœðrunardagar,
- sýrustig og vatnsinnihald jarðvegsins við upphaf og lok prófunarinnar.

Prófunarniðurstöður:

- dánartíðni fullvaxinna dýra (%) í hverju prófunarláti við lok fyrstu fjögurra vikna prófunarinnar,
- heildarþyngd fullvaxinna dýra í hverju prófunarláti við upphaf prófunarinnar,
- breytingar á líkamsþyngd lifandi fullvaxinna dýra (% af upphafsþyngd) í hverju prófunarláti eftir fyrstu fjórar vikur prófunarinnar,
- fjöldi ungvíðis sem verður til í hverju prófunarláti við lok prófunarinnar,
- lýsing á augljósum eða meinafræðilegum einkennum eða greinilegum breytingum á atferli,
- niðurstöður sem fást með viðmiðunarprófunaríðefninu,
- LC₅₀, styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif og/eða EC_x (t.d. EC₅₀, EC₁₀) fyrir æxlun, ef einhver af gildunum eiga við með öryggisbilum, og línurit aðlagða líkansins sem er notað við útreikningana, allar upplýsingar og athuganir sem koma að gagni við túlkun niðurstaðna.
- ferill fyrir tengsl milli skammts og svörunar,
- niðurstöður fyrir hvert prófunarlát.

Frávik frá þeim verkferlum sem lýst er í þessari prófunaraðferð og öll óvenjuleg tilvik meðan á prófuninni stendur.

HEIMILDIR

- 1) Jaenicke, J. (1982). "*Eisenia foetida*" is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- 2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 - 282.
- 3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. *Mitt. Biol. Bundesanst. f. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 320, p. 50-82.
- 4) Kafli C.8 í þessum viðauka, Eiturhrif á ánamaðka.
- 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). *Lombriens 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, Geneva.
- 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, Geneva.
- 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, Geneva.
- 17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). *Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test*. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.
- 18) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- 19) Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. — Charles Griffin & Company Ltd, London.
- 20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction *Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- 21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- 22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- 23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple 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.

*1. viðbætur***Skilgreiningar**

Eftirfarandi skilgreiningar gilda fyrir þessa prófunaraðferð:

Íðefni er efni eða blanda.

EC_x (áhrifastyrkur fyrir x% áhrif) er styrkur sem veldur x% áhrifum á prófunarlífverur á tilteknu váhrifatímabili, samanborið við samanburðarsýni. Til dæmis er EC₅₀ styrkur sem áætlað er að valdi áhrifum í endapunkti prófunar hjá 50% af váhrifaþýðinu á tilteknu váhrifatímabili. Í þessari prófun er áhrifastyrkurinn gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs eða massi prófunariðefnis á hverja flatareiningu jarðvegs.

LC₀ (ekki banvænn styrkur) er sá styrkur prófunariðefnis sem drepur engar af prófunarlífverunum, sem verða fyrir váhrifum, á tilteknu tímabili. Í þessari prófun er LC₀ gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs.

LC₅₀ (miðgildisbanastyrkur) er sá styrkur prófunariðefnis sem drepur 50% prófunarlífverunum, sem verða fyrir váhrifum, á tilteknu tímabili. Í þessari prófun er LC₅₀ gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs eða massi prófunariðefnis á hverja flatareiningu jarðvegs.

LC₁₀₀ (banvænn styrkur) er sá styrkur prófunariðefnis sem drepur 100% af prófunarlífverunum, sem verða fyrir váhrifum, á tilteknu tímabili. Í þessari prófun er LC₁₀₀ gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) er minnsti styrkur prófunariðefnisins sem hefur tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$). Í þessari prófun er minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs eða massi prófunariðefnis á hverja flatareiningu jarðvegs. Allur prófunarstyrkur yfir minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif skal alla jafna sýna áhrif sem eru tölfræðilega frábrugðin áhrifunum af samanburðinum. Rökstyðja verður öll frávik frá fyrrgreindu í prófunarskýrslunni.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) er mesti styrkur prófunariðefnisins, sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif, þar sem engin áhrif koma fram. Í þessari prófun hefur styrkur, sem samsvarar styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif, engin tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun.

Æxlunarhraði: Meðalfjöldi ormaungviðis sem til verður á fjölda fullvaxinna dýra á prófunartímabilinu.

Prófunariðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

2. viðbætur

Ákvörðun á hámarksvatnsheldni jarðvegsins

Komið hefur í ljós að eftirfarandi aðferð við ákvörðun á hámarksvatnsheldni jarðvegs er hentug. Henni er lýst í viðauka C við ISO DIS 11268-2 (1. heimild).

Tilgreindu magni (t.d. 5 g) af prófunarjarðvegsundirlagi er safnað með hentugu áhaldi (kjarnabor o.s. frv.). Síupappír eru settur fyrir botninn á rörinu, síðan er það fyllt af vatni og sett á stand í vatnsbaði. Rörið skal smám saman fært í kaf þar til vatnshæðin er ofan við hæð jarðvegsins. Það skal síðan skilið eftir í vatninu í u.þ.b. þrjár klst. Þar eð vatn sem hárpípur í jarðvegi draga í sig situr ekki allt eftir skal láta hripa úr jarðvegssýninu í tvær klst. með því að setja rörið á beð með mjög blautum, fínuldum kvarssandi í lokuðu ílátí (til að koma í veg fyrir þornun). Síðan skal þurrka sýnið þar til það hefur náð stöðugum massa við 105 °C og vega það. Þá er hægt að reikna út vatnsheldni eftir því sem hér segir:

$$\text{Vatnsheldni (í \% af þurrmassa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Þar sem:

S = vatnsmettað undirlag + massi rörs + massi síupappírs

T = tara (massi rörs + massi síupappírs)

D = þurrmassi undirlags

HEIMILDIR:

- 1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

*3. viðbætur***Ákvörðun á sýrustigi jarðvegs**

Eftirfarandi aðferð við að ákvarða sýrustig jarðvegs byggist á lýsingu sem gefin er í ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (1. heimild).

Tilgreint magn af jarðvegi er þurrkað við stofuhita í u.þ.b. 12 klst. Síðan er tilreidd sviflausn (inniheldur a.m.k. 5. g af jarðvegi) sem nemur fimmföldu rúmmáli af annað hvort 1 M lausn af kalíumklóríði af greiningarhreinleika eða 0,01 M lausn af kalsíumklóríði af greiningarhreinleika (CaCl_2). Sviflausnin er síðan hrist rækilega í fimm mínútur og síðan látin setjast í a.m.k. 2 klst. en ekki lengur en 24 klst. Síðan er sýrustig fljótandi fasans mælt með sýrustigsmæli sem hefur verið kvarðaður fyrir hverja mælingu með viðeigandi röð jafnalausna (t.d. pH-gildi 4,0 og 7,0).

HEIMILDIR:

- 1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

4. viðbætur

Ræktun *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*

Undaneldi skal helst fara fram í loftslagsklefa við $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Við þetta hitastig og með nægu föðri verða ormarnir fullvaxnir eftir 2 til 3 mánuði.

Hægt er að rækta báðar tegundir í margs konar dýraúrgangi. Ræktunarmiðill sem mælt er með er 50:50 blanda af hrossataði eða kúaskít og mó. Gera skal athugun til að tryggja að kýr eða hestar, sem húsdýraáburðurinn er fenginn úr, fái ekki lyf eða séu meðhöndluð með efnum, s.s. vaxtarhvötum, þráðormaeitri eða svipuðum dýralyfjum, sem gætu haft skaðleg áhrif á ormana meðan á prófuninni stendur. Mælt er með að húsdýraáburðinum sé safnað frá „lífrænni“ uppsprettu því reynslan hefur sýnt að húsdýraáburður, sem er tiltækur á markaði og notaður sem garðáburður, getur haft skaðleg áhrif á ormana. Miðillinn skal hafa pH-gildi sem er u.þ.b. 6 til 7 (stillt með kalsíumkarbónati), litla jónaeðlisleiðni (minna en 6 mS/cm eða minna en 0,5 % saltstyrk) og skal ekki vera óhóflega mengað af ammoníaki eða dýrahlandi. Undirlagið skal vera rakt en ekki of blautt. Ræktunarkassar, sem eru 10 til 50 lítrar að rúmtaki, eru hentugir.

Til að fá orma á svipuðum aldri og af svipaðri stærð (massa) er best að hefja ræktunina með egghylkjum. Þegar ræktuninni hefur verið komið á fót er henni haldið við með því að setja fullvaxna orma í undaneldisbox með nýju undirlagi í 14 til 28 daga til að fleiri egghylki geti myndast. Síðan eru fullvöxnu dýrin fjarlægð og ungvíðið sem kemur úr egghylkjunum notað sem grunnur að næstu ræktun. Ormarnir eru fóðraðir stöðugt með dýraúrgangi og fluttir af og til í nýtt undirlag. Reynslan hefur sýnt að loftþurrkaður finmalaður kúaskítur eða hrossatað eða haframjöl er hentugt fóður. Það skal tryggt að kýr eða hestar, sem húsdýraáburðurinn er fenginn úr, fái ekki lyf eða séu meðhöndluð með efnum, s.s. vaxtarhvötum, sem gætu haft skaðleg áhrif á ormana meðan á prófuninni stendur. Ormarnir sem skriða úr egghylkjunum eru notaðir í prófanir þegar þeir eru á bilinu 2 til 12 mánaða gamlir og teljast vera fullvaxnir.

Ormar geta talist heilbrigðir ef þeir hreyfa sig gegnum undirlagið, reyna ekki að fara úr því og æxlast samfellt. Ef ormarnir hreyfa sig mjög hægt og afturendinn á þeim er gulur bendir það til þess að undirlagið sé orðið of rýrt. Í því tilviki er mælt með því að setja nýtt undirlag og/eða minnka þéttleika dýrana.

*5. viðbætur***Tækni til að telja ormaungviði sem skriður úr egghylkjum**

Handflokkun orma úr jarðvegsundirlaginu er mjög tímafrek. Þess vegna er mælt með tveimur staðgönguaðferðum:

- a) Prófunarflátin eru sett í vatnsbað sem er 40 °C til að byrja með en hækkar í 60 °C. Eftir u.þ.b. 20 mínútur ætti ormaungviðið að koma upp á jarðvegsyfirborðið og þaðan er auðvelt að fjarlægja það og telja.
- b) Hægt er að skola prófunarjarðveginn í sigti með aðferð sem þróuð var af van Gestel o. fl. (1. heimild) að því tilskildu að mórinn og húsdýraáburðurinn eða haframjöldið, sem bætt var við jarðveginn, hafi verið möluð í fint duft. Tvö sigti með möskvastærðina 0,5 mm (þvermál 30 cm) eru sett hvort ofan á annað. Innihald prófunarfláts er skolað gegn um sigtin með öflugum streymi kranavatns sem skilur ungu ormana og egghylkin að mestu leyti effir í efra sigtinu. Mikilvægt er að taka mið af því að halda skal öllu yfirborði efra sigtisins blautu meðan þessi aðgerð stendur yfir til að ormaungviðið fljóti ofan á vatnslagi sem kemur í veg fyrir að það renni gegn um möskvana í sigtinu. Bestu niðurstöður fást þegar notaður er sturtuhaus.

Þegar allt jarðvegsundirlagið hefur verið skolað gegn um sigtið er hægt að skola ungvíðið og egghylkin úr efra sigtinu og í skál. Innihald skálarinnar er síðan látið standa þannig að tóm egghylki geti flotið upp á yfirborð vatnsins og full egghylki og ungir ormar sokkið til botns. Síðan er hægt að hella standandi vatninu af og flytja ungu ormana og egghylkin í ræktunarskál sem inniheldur dálítið vatn. Hægt er að fjarlægja ormana til talningar með prjóni eða töng.

Reynslan hefur sýnt að aðferð a) hentar betur til að skilja út ormaungviði sem gæti jafnvel skolast gegnum 0,5 mm sigti.

Alltaf skal ákvarða skilvirkni aðferðarinnar sem er notuð til að fjarlægja ormana (og egghylkin, ef við á) úr jarðvegsundirlaginu. Ef ungvíði er safnað með handflokkunartækninni er ráðlegt að framkvæma aðgerðina tvisvar á öllum sýnum.

HEIMILDIR:

- 1) Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.

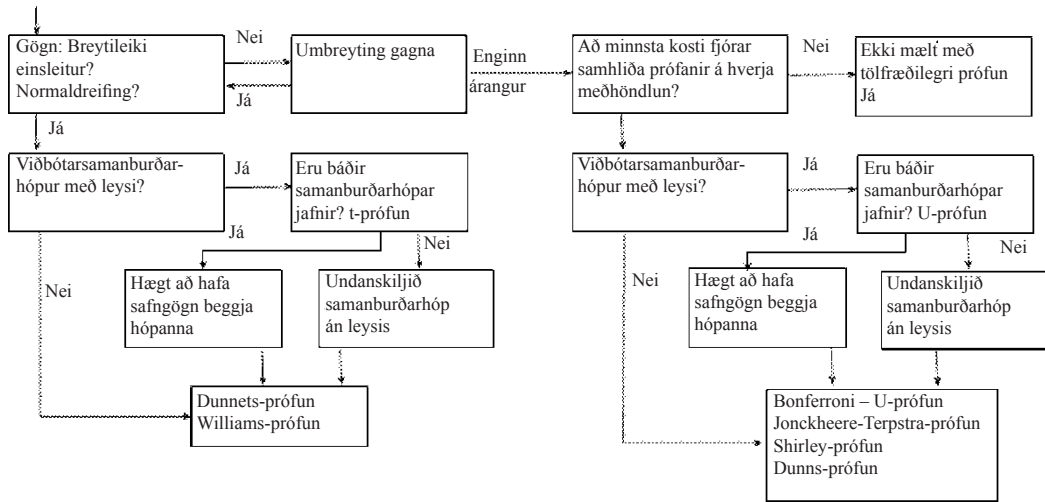
6. viðbætur

Yfirlit yfir tölfræðilegt mat á gögnum (ákvörðun á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif)

Stikabundin próf

Óstikabundin próf

Upphaf



**C.34. ÁKVÖRÐUN Á HÖMLUN Á VIRKNI LOFTFÆLINNA BAKTERÍA — MINNKUN Á GAS-
MYNDUN Í (SKÓLP)SEYRU VEGNA LOFTFIRRTS NIÐURBROTTS**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 224 um prófanir (2007). Íðefni sem eru losuð í vatnsumhverfið fara bæði gegnum loftháð og loftfirrð svæði þar sem þau brotna e.t.v. niður og/eða geta hamlað bakteríuvirkni; í sumum tilvikum geta þau verið óhreyfð í áratugi eða lengur á loftfirrðum svæðum. Í skólphreinsun er fyrsta stigið, fyrsta botnfelling, loftháð í flötinu og loftfirrt í undirliggjandi seyrinni. Á öðru stigi er þessu fylgt eftir með loftháðu svæði í loftunarþró virku seyrinnar og loftfirrðu svæði í undirliggjandi seyrinni í botnfellingarþrónni á því stigi. Seyra af báðum þessum stigum fer yfirleitt í gegn um loftfirrða meðhöndlun þar sem myndast metan og koltvísýringur sem eru yfirleitt notuð til að framleiða rafmagn. Í umhverfinu í heild sinni er líklegt að íðefni, sem komast í set í flóum, árósum og hafinu, verði eftir á þessum loftfirrðu svæðum um ókomna tíð ef þau eru ekki lífbrjótanleg. Einkum kemst stór hluti sumra íðefna til þessara svæða vegna eðlissrænna eiginleika, s.s. lítillar vatnsleysni, mikils ásogs á svifagnir sem og að þau eru ekki lífbrjótanleg við loftháðar aðstæður.
2. Þó að það sé æskilegt að íðefni, sem er sleppt út í umhverfið, séu lífbrjótanleg bæði við loftháðar og loftfirrðar aðstæður er mikilvægt að slík íðefni hamli ekki virkni örvera á þessum svæðum. Í Bretlandi hafa komið upp nokkur tilvik algerrar hömlunar á metanmyndun, sem stafar t.d. af pentaklórphenóli í losun efna frá iðnaði, sem leiddi til mjög kostnaðarsamra flutninga á hömluðu seyrinni frá niðurbrotstönknum til „öruggra“ svæða og innflutnings á heilbrigðri niðurbrottsseyru frá nálægum stöðvum. Samt hafa komið upp mörg tilvik þar sem nokkur önnur íðefni hafa valdið minni truflun á niðurbroti, þ.m.t. alifatísk halóvetniskolefni (þurrhreinun) og þvotta- og hreinsiefni, sem leiðir til verulegrar skerðingar á skilvirkni niðurbrotstanka.
3. Einungis ein prófunaraðferð C.11 (1. heimild) fjallar um hömlun á bakteríuvirkni (öndun virkrar seyr) og metur áhrif prófunariðefnis á hraða súrefnisupptöku í næringarefnablöndu. Aðferðin hefur mikið verið notuð til að gera snemma viðvart um hugsanleg skaðleg áhrif íðefna á loftháða meðhöndlun skólps sem og til að gefa vísbendingu um hvaða styrkleikar prófunariðefna, sem á að nota í ýmsar prófanir á lífbrjótanleika, eru ekki hamlandi. Prófunaraðferð C.43 (2. heimild) gefur takmarkað færi á að ákvarða eiturhrif prófunariðefnis á gasmyndun í loftfirrðri seyr, sem er þynnt í einn tíunda af venjulegum styrk sínum af föstum efnum, til að gefa þá nákvæmni sem krafist er í mati á lífniðurbroti í hundradshlutum. ISO-hópurinn ákvað að búa til aðferð þar sem notuð er óþynnt seyra vegna þess að þynnt seyra gæti verið næmari fyrir hamlandi íðefnum. Að minnsta kosti þrjár textar voru skoðaðir (frá Danmörku, Þýskalandi og Bretlandi) og að lokum voru tveir ISO-staðlar búnir til, í öðrum er notuð óþynnt seyra, ISO 13 641-1 (3. heimild) og í hinum er notuð seyra sem er þynnt 1:100, ISO 13 641-2 (4. heimild) sem dæmi um eðju og set með litlu bakteríuþýði. Báðar aðferðirnar voru látnar gangast undir hringprófun (5. heimild); 1. hluti var samþykktur sem tækur staðall en upp kom ágreiningur um 2. hluta. Bretland taldi að rannsaka þyrfti aðferðina betur sökum þess að verulegur hluti þátttakenda greindi frá mjög lítilli eða engri gasmyndun, að hluta til vegna þess að gasrými væri of stórt að hundradshluta (við 75%) fyrir mesta næmi.
4. Í eldri verkum í Bretlandi (6.–7. heimild) var þrýstimælingaraðferð lýst þar sem notuð var óþynnt niðurbrottsseyra, ásamt óunninni skólpeðju sem næringarefnablöndu, í 500 ml flöskum; búnaðurinn var ómeðfærulegur og andstyggilegur daunn af óunnu seyrinni. Síðar notuðu Wilson o.fl. samþjappaðri og heppilegri búnað Shelton og Tiedje (8. heimild), eins og Battersby og Wilson (9. heimild) þróuðu hann, með góðum árangri. (10). Kawahara o.fl. (11. heimild) tilreiddu, með góðum árangri, staðlaðri seyrur á rannsóknarstofu til notkunar í prófanir á lífbrjótanleika við loftfirrðar aðstæður og hömlun á nokkur íðefni. Óunninni seyrur sem næringarefnablöndu var einnig skipt út við framkvæmd prófana, annað hvort með loftfirrðri seyr sem er þynnt 1:100 eða með eðju, seti o.s.frv. með litla bakteríuvirkni
5. Þessi aðferð getur gefið upplýsingar sem eru gagnlegar til að spá fyrir um líkleg áhrif prófunariðefnis á gasmyndun í loftfirrðum niðurbrotstönkum. Þó geta einungis lengri prófanir, þar sem betur er líkt eftir niðurbrotstanki í notkun, gefið til kynna hvort aðlögun örveranna að prófunariðefninu getur átt sér stað eða hvort íðefni, sem líklegt er að dragi seyrna í sig og ásogist á hana, geti byggt upp eiturstyrk á lengri tíma en gefinn er í þessari prófun.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

6. Deiliskammtar af blöndu af seyru með loftfirrðu niðurbroti (heildarmagn fastra efna 20–40 g/l) og niðurbriótanlegri næringarefnalausn eru ræktaðir einir og sér og samtímis með röð styrkleika af prófunaríðefninu í lokuðum ílátum í allt að 3 daga. Gasmagnið (metan ásamt koltvísýringi) sem myndast er mælt með þrýstingsaukningunni (Pa) í flöskunum. Hömlun á gasmyndun vegna hinna mismunandi styrkleika prófunaríðefnisins er reiknuð út í hundradshlutum frá magninu sem myndast, annars vegar í prófunarflöskunum og hins vegar í viðmiðunarflöskunum. EC_{50} og aðrir hrifstyrkir eru reiknaðir út frá ferlum hömlunar í hundradshlutum á móti styrk prófunaríðefnanna eða, sem algengara er, af logra hans.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

7. Prófunaríðefni skal alla jafna nota í hreinasta formi sem er auðveldlega aðgengilegt þar eð óhreinindi í sumum íðefnum, t.d. klórfenól, geta verið mun eitraðri en prófunaríðefnið sjálft. Þó skal hafa í huga þörfina fyrir að prófa íðefni í því formi sem þau eru framleidd/gerð aðgengileg á almennum markaði. Almennt er ekki mælt með notkun á samsettum vörum en notkun á samsettu efni getur átt við ef um er að ræða torleysanleg prófunaríðefni. Meðal eiginleika prófunaríðefna, sem skulu vera fyrir hendi, eru leysni í vatni og nokkrum lífrænum leysum, gufuþrýstingur, ásogsstuðull, vatnsrof og lífbrjótanleiki við loftfirrðar aðstæður.

NOTKUNARSVIÐ AÐFERÐARINNAR

8. Prófunin hentar fyrir íðefni sem eru leysanleg eða óleysanleg í vatni, þ.m.t. rokgjörn íðefni. Sérstök varúð er þó nauðsynleg að því er varðar efni sem hafa litla vatnsleysni (sjá 12. heimild) og eru mjög rokgjörn. Einnig er hægt að nota sáð frá öðrum loftfirrðum stöðum, t.d. eðju, mettuðum jarðvegi eða seti. Bakteríur í loftfirrðum kerfum sem hafa áður orðið fyrir váhrifum frá eitruðum íðefnum geta hafa aðlagast þeim þannig að þær viðhalda virkni sinni í návist lífframandi íðefna. Sáð frá aðlöguðum bakteríukerfum getur verið þöfnara gagnvart prófunaríðefninu en sáð sem fæst frá kerfum sem hafa ekki aðlagast.

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

9. Til þess að fylgjast með aðferðinni er gerð prófun á viðmiðunaríðefni með því að setja upp víðeigandi ílát samhliða venjulegu prófununum; komið hefur í ljós að 3, 5-díklórfenól skilar samkvæmri hömlun á loftfirrðri gasmyndun sem og á súrefnisupptöku virkrar seyru og öðrum lífefnafræðilegum efnahvörfum. Komið hefur í ljós að tvö önnur íðefni hamlu metanmyndun ennþá meira en 3, 5-díklórfenól, þ.e.a.s. metýlen-bis-þíósýanat og pentaklórfenól, en niðurstöður með þeim hafa ekki verið fullgiltar. Ekki er mælt með pentaklórfenóli þar eð ekki er auðvelt að fá efnið í hreinu formi.

SAMANBURÐARNÁKVÆMNI NIÐURSTAÐNA

10. Í alþjóðlegri hringprófun (5. heimild) var einungis sæmileg samanburðarnákvæmni milli 10 rannsóknarstofa, sem tóku þátt, á EC_{50} -gildum fyrir 3, 5-díklórfenól og 2-brómetansúlfónsýru. (Styrkbilið fyrir það fyrra var 32 mg/l til 502 mg/l og 220–2190 mg/l fyrir það síðara.)

Fjöldi rannsóknarstofa	Sem mg/l			Sem mg/g seyru		
	meðaltal	sf	fs (%)	meðaltal	sf	fs (%)
3, 5-díklórfenól						
10	153	158	103	5	4,6	92
2-brómetansúlfónsýra						
10	1058	896	85	34	26	76

EC₅₀-gögn úr hringprófun — óþynnt seyra

11. Hár fráviksstuðull milli rannsóknarstofa endurspeglar að miklu leyti mismun á næmi örvera í seyrinni, annað hvort vegna fyrri váhrifa eða engra fyrri váhrifa af prófunariðefninu eða öðrum efnafræðilega skyldum íðefnum. Sú nákvæmni sem var notuð við að ákvarða EC₅₀-gildið á grundvelli styrksins í seyrinni var lítið betri en „títrunar“-gildið (mg/l). Rannsóknarstofurnar þrjár sem gerðu grein fyrir nákvæmni EC₅₀-gilda sinna fyrir 3,5-díklórifenól sýndu miklu lægri fráviksstuðul (22, 9, og 18%, eftir því sem við á, fyrir EC₅₀ mg/g) en sem svarar meðaltölum fyrir allar rannsóknarstofurnar 10. Einstök meðaltöl rannsóknarstofanna þriggja voru 3,1, 3,2 og 2,8 mg/g, eftir því sem við á. Lægri viðunandi fráviksstuðlar innan rannsóknarstofa, samanborið við miklu hærri gildi fráviksstuðla milli rannsóknarstofa, þ.e. 9–22% samanborið við 92%, gefa til kynna að það sé marktækur munur á eiginleikum mismunandi tegunda seyr.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

12. Gerð er krafa um venjulegan búnað fyrir rannsóknarstofur og eftirfarandi:

- a) Ræktunarkassi — neistalaus og með nákvæmni 35 °C ± 2 °C.
- b) Þrýstipólin prófunarilát úr gleri af viðeigandi nafnstærð ⁽⁷⁾, hvert um sig með gasþéttri, húðaðri himnu sem getur þolað álag sem nemur u.þ.b. 2 börum eða 2 × 10⁵ Pa (til húðunar er t.d. notað PTFE = pólýtetraflúoretýlen). Mælt er með glersemiflöskum með nafnrúmmálið 125 ml, u.þ.b. 160 ml raunrúmmál, lokaðar með sermihimnu ⁽⁸⁾ og krumpuðum álhringjum (e. *crimped aluminium ring*); einnig er hægt að nota flöskur með heildarrúmmál á bilinu 0,1 til 1 lítri með góðum árangri,
- c) Nákvæmnisþrýstingsmælir (e. *precision pressure-meter*) ⁽⁹⁾ með nál.

Heildargasmyndun (metan ásamt koltvísýringi) er mæld með þrýstingsmæli sem er aðlagður þannig að hann geti mælt og loftað gasið sem myndast. Dæmi um hentugt tæki er nákvæmnisþrýstingsmælir, sem haldið er á, sem tengdur er við sprautunál; þríátta gasþéttur loki auðveldar losun umframþrýstings (1. viðbætur). Nauðsynlegt er að halda innra rúmmáli þrýstiskynjaraleiðslna og loka eins litlu og unnt er til þess að skekkjur, sem leiða af því að ekki er fylgst nógu vel með rúmmáli búnaðarins, séu óverulegar,

- d) Einangruð ker til að flytja niðurbrotsseyru.
- e) Þríátta þrýstilokar.
- f) Sigti með 1 mm ferhyrnum möskvum.
- g) Geymir fyrir niðurbrotsseyru, flaska úr gleri eða eðlisþungu pólýtýleni, rúmtak u.þ.b. 5 lítrar, með hræripinna og búnaði til að hleypa straumi köfnunarefnisgass (sjá 13. lið) gegnum kollrúmið.
- h) Himnusiur (0,2 µm) til að dauðhreinsa næringarefnablönduna.

⁽⁷⁾ Ráðlögð stærð er 0,1 til 1 lítri.

⁽⁸⁾ Mælt er með notkun á gasþéttri sílikonhimnu. Enn fremur er mælt með því að gasþéttu loka, einkum himna úr bútýlgúmmí, sé prófuð því nokkuð margar himnur, sem fást á almennum markaði, eru ekki nægilega gasþéttar m.t.t. metans og sumar himnur haldast ekki þéttar þegar stungið er í þær með nál við þessari prófunarskilyrði.

— Mælt er með gasþéttum, húðuðum himnum og þær skulu notaðar fyrir rokgjörn íðefni (sumar himnur, sem fást á almennum markaði, eru frekar þunnar, þynnri en 0,5 cm, og haldast ekki gasþéttar eftir að stungið hefur verið í þær með sprautunál).

— Mælt er með himnum úr bútýlgúmmí (u.þ.b. 1 cm) ef prófunarefnið eru ekki rokgjörn (þær haldast yfirleitt gasþéttar eftir að stungið hefur verið í þær).

— Mælt er með því fyrir prófunina að himnurnar séu skoðaðar vandlega m.t.t. til þess hve vel þær haldast gasþéttar eftir að stungið hefur verið í þær).

⁽⁹⁾ Nota skal mælinn og kvarða hann með reglulegu millibili samkvæmt leiðbeiningum framleiðandans. Ef notaður er þrýstingsmælir af tilskildum gæðum, t.d. í hylki úr stálhimnu, er kvörðun í rannsóknarstofunni ekki nauðsynleg. Stofnun með leyfi skal kvarða hann með því millibili sem mælt er með. Hægt er að prófa nákvæmni kvörðunarinnar á rannsóknarstofu með eins punkts mælingu við 1 × 10⁵ Pa samanborið við þrýstingsmæli með vélrænni skífu. Ef þessi punktur er mældur rétt helst línuleikinn einnig óbreyttur. Ef annar mælingabúnaður er notaður (án kvörðunar sem er vottuð af framleiðanda) er mælt með umreikningi á öllu styrkbílinu með reglulegu millibili (2. viðbætur).

- i) Míkrósprautur fyrir gasþétta tengingu þrýstiskynjarans (sjá c-lið 12. liðar) við kollrúmið í flöskunum (sjá b-lið 12. liðar); einnig til að bæta óleysanlegum fljótandi prófunarefnum í flöskurnar.
- j) Hanskakassi, valfrjáls en mælt með honum, með vægum jákvæðum köfnunarefnisþrýstingi.

Prófefni

13. Nota skal prófefni af greiningarhreinleika allan tímann. Ávallt skal nota köfnunarefnisgas af miklum hreinleika sem inniheldur minna en 5 µl/l af súrefni.

Vatn

14. Ef þynning er nauðsynleg á einhverju stigi er notað afjónað vatn sem er afloftað áður. Greiningareftirlit með þessu vatni er ekki nauðsynlegt en tryggja skal að afjónunar búnaðurinn fái reglulegt viðhald. Einnig er notað afjónað vatn til að tilreiða stofnlausnir. Áður en loftfælnu sáði er bætt við einhverja lausn eða þynningu prófunarefnis er gengið úr skugga um að þær séu súrefnislausar. Þetta er annað hvort gert með því að blása köfnunarefnisgasi gegnum þynningarvatnið (eða gegnum þynningararnar) í 1 klst. áður en sáðinu er bætt við eða með því að hita þynningarvatnið að suðumarki og kæla niður í stofuhita í súrefnislausu andrúmslofti.

Seyra sem er brotin niður

15. Seyru með virku niðurbroti er safnað úr niðurbrotstanki í skólphreinsistöð, eða að öðrum kosti úr niðurbrotstanki á rannsóknarstofu, sem meðhöndlar seyrur úr skólpi sem er aðallega frá heimilum. Hægt er að finna hagnýtar upplýsingar varðandi seyrur úr niðurbrotstanki á rannsóknarstofu annars staðar (11. heimild). Niðurbrotsseyra frá iðnaðarskólphreinsistöð er athugandi ef ætlunin er að nota aðlagð sáð. Notaðar eru flöskur með viðum hálsi úr eðlisþungu pólýetýleni eða svipuðu efni, sem getur þanist út, til að safna seyrinni. Seyru er bætt í sýnisflöskurnar upp að u.þ.b. 1 cm frá toppi flöskunnar og þeim lokað tryggilega, helst með öryggisloka (e-liður 12. liðar) og settar í einangruð ker (d-liður 12. liðar) til að draga úr hitasjokki þangað til þær eru fluttar í ræktunarkassa sem er haldið við 35 °C ± 2 °C. Þegar flöskurnar eru opnaðar er þess gætt að losa umframgasþrýsting annað hvort með því að losa lokið varlega eða með þríátta þrýstilosunarlokanum (e-liður 12. liðar). Æskilegt er að nota seyruna innan fárra klukkustunda frá því að henni er safnað, annars skal hún geymd við 5 °C ± 2 °C undir köfnunarefniskollrúmi í allt að þrjú daga en á þessum tíma tapast yfirleitt lítil virkni.

Aðvörun — niðurbrotsseyra myndar eldfim gös sem skapa eld- og sprengihættu: hún getur einnig innihaldið lífverur sem geta verið sjúkdómsvaldandi og því skal viðhafa viðeigandi varúðarráðstafanir þegar seyra er meðhöndluð. Af öryggisástæðum skal ekki nota glerlát til að safna seyrur.

Sáð

16. Seyran er blönduð rétt fyrir notkun með því að hræra varlega í henni og hella henni gegnum sigti með 1 mm² möskvum (f-liður 12. liðar) í hentuga flösku (g-liður 12. liðar) og köfnunarefni er látið streyma gegnum kollrúm hennar. Sýni er sett til hliðar til að mæla styrk heildarmagns þurrefna (sjá t.d. ISO 11 923 (13. heimild) eða jafngildan ESB-staðal. Almenn er seyrarnar notuð án þynningar. Styrkur fastra efna er yfirleitt á bilinu 2–4% (massi miðað við rúmmál). Athuga skal pH-gildi seyrunnar og stilla, ef nauðsyn krefur, að 7 ± 0,5.

Næringarefnablanda fyrir prófun

17. Tíu g af næringarseyði (t.d. Oxoid), 10 g af gerkjarna og 10 g af D-glúkósa eru leyst upp í afjónuðu vatni og þynnt í 100 ml. Dauðhreinun með síun gegnum 0,2 µm himnusíu (h-liður 12. liðar) og notkun samstundis eða geymsla við 4 °C, að hámarki í 1 dag.

Prófunaríðefni

18. Aðskilin stofnlausn er tilreidd fyrir hvert vatnsleysanlegt prófunaríðefni og inniheldur t.d. 10 g/l af íðefninu í súrefnislausu þynningarvatni (14. liður). Viðeigandi magn þessara stofnlausna er notað til að tilreiða hvarfblöndur með stigskiptum styrk. Að öðrum kosti er tilreidd röð þynninga af hverri stofnlausn þannig að magnið sem bætt er í prófunarflöskurnar er það sama fyrir hvern endanlegan styrk sem krafist er. Aðlaga skal pH-gildi stofnlausnanna í 7 ± 0,2 ef nauðsyn krefur.

19. Að því er varðar prófunaríðefni sem eru ekki nægilega leysanleg í vatni skal fletta upp í ISO 10 634 (12. heimild) eða jafngildum ESB-staðli. Ef nota þarf lífrænan leysi skal forðast leysa, s.s. klóróform og koltetraklóríð, sem vitað er að hamla metanmyndun allverulega. Lausn með viðeigandi styrk af vatnsóleysanlegu íðefni er tilreidd í hentugum rokkgjörnum leysi, t.d. asetoni eða dietýleter. Nauðsynlegt magn af leysislausn er sett í tómar prófunarflöskurnar (b-liður 12. liðar) og leysirinn látinn gufa upp áður en seyrinni er bætt við. Að því er varðar aðrar meðhöndlanir skal nota ISO 10 634 (12. heimild) eða jafngildan ESB-staðal en hafa í huga að öll yfirborðsvirk efni, sem eru notuð til að mynda ýrulausnir, geta haft hamlandi áhrif á gasmyndun við loftfirrðar aðstæður. Ef talið er að tilvist lífrænna leysa og ýruefna valdi skemmdum er hægt að bæta prófunaríðefninu sem dufti eða vökva beint í prófunarblönduna. Hægt er að sprauta rokkgjörnum íðefnum og vatnsóleysanlegum fljótandi prófunaríðefnum í sermiflöskur með sáði með því að nota mikrósprautur (i-liður 12. liðar).
20. Prófunaríðefnum er bætt í flöskur til að fá jafnhlutfallaraðir af styrkleikum, t.d. 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l og 15,6 mg/l. Ef styrkbil eiturrhifa fyrir áþekkt íðefni er ekki þekkt skal fyrst framkvæma skammtastærðaprófun til bráðabirgða með styrk sem nemur 1000 mg/l, 100 mg/l og 10 mg/l til að ákvarða viðeigandi styrkbil.

Viðmiðunariðefni

21. Vatnslausn með 3,5-díklórphenóli (10 g/l) er tilreidd með því að bæta smám saman við lágmarksmagninu 5 mól/l af natríumhýdroxíðlausn við fasta efnið, meðan hrist er, þangað til það er uppleyst. Síðan er afilduðu (e. *de-oxygenated*) þynningarvatni (14. liður) bætt við tilskilið magn; háttíðnihljóðsundrun getur auðveldað leysni. Hægt er að nota önnur viðmiðunariðefni þegar meðaltalsstyrkbilið EC₅₀ hefur fengist í a.m.k. þremur prófunum með mismunandi sáði (mismunandi uppsprettur eða mismunandi söfnunartími).

TRUFLUN/SKEKKJUR

22. Sumir efnisþættir seyrur geta að öllum líkindum hvarfast við hugsanlega lata og gert þá óaðgengilega fyrir örverur þannig að hömlunin verði minni eða engin. Ef seyran inniheldur þegar íðefni sem er hamlandi fást þar að auki rangar niðurstöður þegar íðefnið er prófað. Fyrir utan þessa möguleika er vitað um nokkra þætti sem geta leitt til rangra niðurstaðna. Þeir eru taldir upp í 3. viðbæti ásamt aðferðum til að eyða eða a.m.k. fækka skekkjum.

PRÓFUNARAÐFERÐ

23. Fjöldi nauðsynlegra samhliða prófana ræðst af því hve mikil nákvæmni er nauðsynleg vegna hömlunarstuðlanna. Ef flöskulokin eru nægilega gasþétt meðan á allri prófuninni stendur er einungis sett upp ein lota (a.m.k. þrjár flöskur) af prófunarflöskum með hverjum styrk sem þörf er á. Á sama hátt er sett upp ein lota af flöskum með viðmiðunariðefni og eitt sett af samanburði. Ef einungis er hægt að treysta á lokin á flöskunum fyrir eina ástungu, eða fáar, er sett upp lota (t.d. þrjár flöskur) af prófunarflöskum fyrir hvert bil (t) sem þarf niðurstöður um, fyrir alla styrkleika prófunaríðefnis sem á að prófa. Á sama hátt eru settar upp „t“ lotur af flöskum fyrir viðmiðunariðefnið og fyrir samanburðinn.
24. Mælt er með að nota hanskakassa (j-liður 12. liðar). Að minnsta kosti 30 mínútum áður en prófun hefst skal setja í gang streymi af köfnunarefnisgasi gegnum hanskakassann sem inniheldur allan búnaðinn sem er nauðsynlegur. Tryggja skal að hitastig seyrunnar sé innan 35 °C ± 2 °C meðan flöskurnar eru meðhöndlaðar og þeim lokað.

Forprófun

25. Ef virkni seyrunnar er ekki þekkt er mælt með því að framkvæma forprófun. Settur er upp samanburður með, t.d. styrk fastra efna sem nemur 10 g/l, 20 g/l og 40 g/l, ásamt næringarefnablöndu en án prófunaríðefna. Einnig skal nota mismunandi magn af hvarfblöndu til að fá þrjú eða fjögur hlutföll kollrúms á móti vökvárumáli. Hentugustu skilyrði, sem gera það kleift að framkvæma tvær daglegar mælingar sem gefa af sér verulegt magn af gasi og losun þrýstings daglega við mesta næmi ⁽¹⁰⁾ án þess að hætta sé á sprengingum, eru valin út frá niðurstöðum um gasrúmmál sem myndast á mismunandi tímabilum.

⁽¹⁰⁾ Þetta á við um tilraunauppsetningu og tilraunaskilyrði þar sem hægt er að áætla gasmagn sem myndast — í viðmiðunarblanksýnum og úr ílátum með 70–80% hömlun — með viðunandi skekkjumörkum.

Prófunariðefnum bætt við

26. Vatnsleysanlegum prófunariðefnum er bætt í tómar prófunarflöskur (b-liður 12. liðar) sem vatnslausn (18. liður). Nota skal a.m.k. þrjú sett af flöskum fyrir hverja röð styrkleika (20. liður). Ef um er að ræða óleysanleg og torleysanleg prófunariðefni er lausn með þeim í lífrænum leysi sprautað með mikrósprautu í tómar flöskur til að fá sett samhliða prófana fyrir hverja fimm styrkleika prófunariðefnisins. Leysirinn er látinn gufa upp með því að láta köfnunarefnisgas streyma yfir yfirborð lausnanna í prófunarflöskunum. Að öðrum kosti er óleysanlegum föstum íðefnum bætt beint í flöskuna sem vegnu magni af fasta efninu.
27. Ef fljótandi prófunariðefnum, sem eru óleysanleg og torleysanleg í vatni, er ekki bætt við með því að nota leysi skal bæta þeim beint í prófunarflöskurnar með mikrósprautu eftir að sáði og prófunarnæringarefnablöndu hefur verið bætt við (sjá 30. lið). Hægt er að bæta rokgjörnum prófunariðefnum við á sama hátt.

Sáði og næringarefnablöndu bætt við

28. Viðeigandi magni af sigtaðri niðurbrotsseyru (sjá 16. lið) er hrært út í 5 lítra flösku (g-liður 12. liðar) meðan köfnunarefnisgas er látið streyma gegnum kollrúmið. Prófunarflöskurnar, sem innihalda prófunariðefni í vatnslausnum eða leysislausnum sem hafa gufað upp, eru skolaðar með köfnunarefnisgasstreymi í u.þ.b. tvær mínútur til að fjarlægja loft. Deiliskömmtum af vel blandaðri seyru, t.d. 100 ml, er deilt í prófunarflöskurnar með pípettu með breiðum oddi eða mæliglasi. Mikilvægt er að fylla pípetturnar í einum áfanga með nákvæmlega því magni af seyru sem þörf er á af því að föst efni í seyrunni botnfalla auðveldlega. Ef meira magn er tekið upp skal tæma pípettuna og byrja aftur.
29. Síðan er hæfilega miklu af næringarefnalausn (17. liður) bætt við til að fá styrk sem nemur 2 g/l af hverju næringarseyði, gerkjarna og D-glúkósa í blönduna en áfram er skolað í gegn með köfnunarefni. Eftirfarandi er dæmi um prófunarlotur.

Endanlegur massastyrkur prófunariðefnis í prófunarflöskum (mg/l)	Rúmmál prófunariðefnisins (ml)		Prófefni og æti (ml)		
	Stofnlausn a) 10 g/l 18. liður	Stofnlausn b) 1 g/l 18. liður	Pynningarvatn 14. liður	Sáð 16. liður	Næringarefnablenda 17. liður
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

Heildarrúmmál í flösku = 160 ml. Rúmmál vökva 103 ml

Gasrúmmál = 57 ml eða 35,6% af heildarrúmmáli.

30. Hæfilegt magn af tónum prófunarflöskum er skolað á sama hátt með köfnunarefnisgasi til að fást við hvers kyns rokgjörn og óleysanleg fljótandi prófunariðefni.

Samanburður og viðmiðunariðefni

31. Að minnsta kosti þrjú sett af flöskum, sem innihalda einungis seyru og næringarefnablöndu, eru sett upp sem samanburður. Fleiri flöskur með samhliða prófun, sem innihalda seyru og næringarefnablöndu ásamt hæfilegri stofnlausn af viðmiðunariðefninu 3,5-díklórfenóli (21. liður), eru settar upp svo úr verði endanlegur styrkur sem nemur 150 mg/l. Þessi styrkur ætti að hamla gasmyndun um u.þ.b. 50%. Að öðrum kosti er sett upp röð styrkleika af viðmiðunariðefninu. Að auki eru settar upp fjórar aukaflöskur til sýrustigsmælinga sem innihalda seyru, afildað vatn og næringarefnablöndu. Prófunariðefninu er bætt við í tvær flöskur í mesta styrk sem er prófaður og afilduðu vatni bætt í hinar tvær flöskurnar sem eftir eru.

32. Tryggja skal að allar flöskurnar — prófunar- og viðmiðunariðefni og samanburður — innihaldi sama magn (V_R) af vökva; ef nauðsyn krefur er afilduðu afjónuðu vatni bætt við (14. liður) til að fylla upp að rúmmálinu. Kollrúmið skal vera á bilinu 10–40% af rúmmáli flöskunnar og raungildið er valið úr gögnum sem fást eftir forprófunina. Eftir að allir efnisþættir hafa verið settir í flöskuna er nálin, sem gasið streymir um, fjarlægð og hverri flösku lokað með gúmmitappa og álhettu (b-liður 12. liðar), tappinn er vættur með dropa af afjónuðu vatni til að auðvelda ísetningu. Innihaldi hvernar flösku er blandað saman með því að hrista þær.

Ræktun í flöskum

33. Flöskurnar eru fluttar í hitastýrðan ræktunarkassa, helst með hristibúnaði, og haldið við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Flöskurnar eru láttnar standa í myrkri. Eftir u.þ.b. klukkustund er þrýstingurinn í flöskunum jafnaður við andrúmsloftið með því að stinga sprautunálinni, sem er fest við þrýstingsmælinn (c-liður 12. liðar), gegnum lokið á hverri flösku fyrir sig, opna lokann og hafa opinn þangað til þrýstingsmælirinn sýnir núll og loka síðan lokanum. Stinga skal nálinni inn með u.þ.b. 45° halla til að koma í veg fyrir að gas leki úr flöskunum. Ef ræktunarkassinn er án hristibúnaðar eru flöskurnar hristar handvirkt tvisvar á dag meðan á öllu ræktunartímabilinu stendur til að kerfið nái jafnvægi. Flöskurnar eru láttnar í ræktun og þeim snúið til að koma í veg fyrir gastap gegnum himnuna. Snúningur á þó ekki við í þeim tilvikum er óleysanleg prófunariðefni gætu setið föst í botni flöskunnar.

Þrýstingsmæling

34. Þegar flöskurnar hafa náð $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ er sýrustig innihaldsins í tveimur af fjórum flöskum, sem settar eru upp í þeim tilgangi, mælt og skráð og innihaldinu fleygt; ræktun í myrkri heldur áfram í flöskunum sem eftir eru. Þrýstingurinn í flöskunum er mældur og skráður tvisvar á dag næstu 48–72 klukkustundirnar með því að stinga nálinni á þrýstingsmælinum gegnum lokið á hverri flösku fyrir sig og þurrka nálinu milli mælinga. Öllum hlutum flöskunnar er haldið við ræktunarhitastigið meðan á mælingunni stendur og skal hún framkvæmd eins hratt og unnt er. Þrýstingsaflesturinn er látinn ná jafnvægi og síðan skráður. Síðan er lokinn opnaður til loftunar og lokað þegar þrýstingurinn mælist 0. Áður en þrýstingurinn er fyrst jafnaður skal prófunin látin standa yfir í 48 klukkustundir, tilnefndur „tími 0“. Fjöldi aflestra og loftunar skal takmarkast við eitt skipti fyrir rokgjörn iðefni (við lok ræktunar) eða tvö til að lágmarka tap á prófunariðefninu (10. heimild).
35. Ekki skal opna lokann ef þrýstingsaflesturinn er neikvæður. Stundum safnast raki fyrir í sprautunálinni og leiðslunni og kemur fram sem lítills háttar undirþrýstingur við aflestur. Í því tilviki er nálin fjarlægð, leiðslan hrist, þerud með pappírþurru og ný nál sett á.

Sýrustigsmæling

36. Sýrustigið í innihaldi hvernar flösku er mælt og skráð eftir síðustu þrýstingsmælinguna.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Framsetning niðurstaðna

37. Summa og meðaltal þrýstings, sem er skráður fyrir hvert tímabil fyrir hvert sett af flöskum í samhlíða prófunum, eru reiknuð út og meðaltal uppsafnaðs heildargasþrýstings fyrir hvert tímabil, fyrir hvert sett af samhlíða prófunum, er reiknað út. Ferill er teiknaður fyrir meðaltal uppsafnaðrar gasmyndunar (Pa) á móti tíma í samanburðar-, prófunar- og viðmiðunarflöskum. Valinn er tími á línulega hluta ferilsins, yfirleitt 48 klukkustundir, og hömlun í hundradshlutum (I) reiknuð út fyrir hvern styrk með jöfnu [1]:

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

þar sem

I = hömlun, í %

P_t = gasþrýstingur sem myndast með prófunarefni á völdum tímamarki, í paskal (Pa),

P_c = gasþrýstingur sem myndast í samanburðinum á sama tímamarki, í paskal (Pa).

Það væri ráðlegt að teikna báða ferlana, þ.e. teikna I sem fall af styrk og einnig sem fall af logra styrks þannig að hægt sé að velja þann feril sem er nær línuleika. Gildi EC_{50} (mg/l) er metið á sjónrænan hátt eða með aðhvarfsgreiningu út frá ferlinum sem er nær línuleika. Til samanburðar gæti verið nýtsamlegra að gefa styrk íðefnisins upp sem mg íðefnis/g af heildarmagni þurrefna. Til að fá þennan styrk er deilt í rúmmálsstyrk (mg/l) með rúmmálsstyrk þurrefna í seyrinni (g/l) (16. liður)

38. Annað hvort er reiknuð út hömlun í hundraðshlutum, sem næst með þeim eina styrk viðmiðunariðefnisins sem notað, eða EC_{50} ef hæfilegur fjöldi styrkleika hefur verið rannsakaður.
39. Meðalþrýstingur gassins sem myndast í samanburðinum $P_c(P_a)$ er umreiknaður yfir í rúmmál, með tilvísun í kvörðunarferil þrýstingsmælisins (2. viðbætur), og út frá þessu er gasafuraksturinn reiknaður út, gefinn upp sem magn sem myndast á 48 klukkustundum úr 100 ml af óþynntri seyru með styrk fastra efna sem nemur 2% (20 g/l) til 4% (40 g/l).

Gildisviðmiðanir

40. Niðurstöður úr fjölsetrarannsóknnum Alþjóðlegu staðlasamtakana (5. heimild) sýndu að viðmiðunariðefnið (3,5-díklórfenól) olli 50% hömlun á gasmyndun í röð styrkleika frá 32 mg/l til 510 mg/l, meðaltal 153 mg/l (10. liður). Þetta styrkbil er það stórt að ekki er hægt að setja ákveðin mörk af öryggi sem gildisviðmiðanir fyrir hömlun; þetta ætti að verða mögulegt þegar þróun hefur sýnt hvernig eigi að framleiða jafnara sáð. Rúmmál gass sem myndaðist í viðmiðunarflöskum á 48 klukkustundum var á bilinu 21 ml/g af þurrefni seyru til 149 ml/g (meðaltal 72 ml/g). Ekki voru greinileg tengsl milli gasmagns sem myndaðist og samsvarandi EC_{50} -gilda. Endanlegt pH-gildi var á bilinu 6,1 til 7,5.
41. Prófunin telst gild ef meira en 20% hömlun næst í viðmiðunarsamanburði sem inniheldur 150 mg/l af 3,5-díklórfenóli, meira en 50 ml af gasi á hvert g af þurrefni myndast í blanksamanburðinum og pH-gildið er innan styrkbilanna 6,2–7,5 við lok prófunarinnar.

Prófunarskýrsla

42. Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunariðefni

- almennt heiti, efnaheiti, CAS-númer, byggingarformúla og viðeigandi eðlisefnafræðilegir eiginleikar,
- hreinleiki (óhreinindi) prófunariðefnisins.

Prófunarskýrslu

- rúmmál vökvainnihalds og kollrúms í prófunarílátum,
- lýsing á prófunarílátunum og gasmælingum (t.d. tegund þrýstingsmælis),
- notkun prófunariðefnis og viðmiðunariðefnis í prófunarkerfinu, prófunarstyrkleikar sem voru notaðir og öll notkun leysa,
- upplýsingar um sáðið sem var notað: heiti skólphreinsistöðvarinnar, lýsing á uppruna skólpsins sem var meðhöndlað (t.d. hiti við vinnslu, viðstöðutími seyru, hvort skól er aðallega frá heimilum eða frá iðnaði o.s.frv.), styrkur fastra efna, virkni gasmyndunar í loftfirrðum niðurbrotstanki, fyrri váhrif eða hugsanleg foraðlögun að eitruðum íðefnum eða söfnunarstað eðju, sets o.s.frv.,
- ræktunarhitastig og -bil,
- fjöldi samhliða prófana.

Niðurstöður

- sýrustig við lok prófunar,
- öll mæld gögn sem er safnað úr ílátum í prófunum, blankprófunum og viðmiðunarsamanburði, eins og við á, (t.d. þrýstingur í Pa eða millibörum) í töfluformi,
- hömlun í hundraðshlutum í prófunar- og viðmiðunarflöskum og ferlar fyrir hömlun á móti styrk,
- útreikningur á EC₅₀-gildum, gefin upp sem mg/l og mg/g,
- gasmyndun á hvert g af seyru á 48 klukkustundum,
- ástæður fyrir því að prófunarniðurstöðum er hafnað,
- umfjöllun um niðurstöður, þ.m.t. um öll frávik frá verkferlum í þessari prófunaraðferð og umfjöllun um öll frávik í prófunarniðurstöðum vegna truflana og skekkna, umfram það sem við er að búast,
- einnig skal fjalla um hvort tilgangurinn með prófuninni var að mæla eiturrhif á örverur sem hafa áður orðið fyrir váhrifum eða á örverur sem hafa ekki áður orðið fyrir váhrifum.

HEIMILDIR

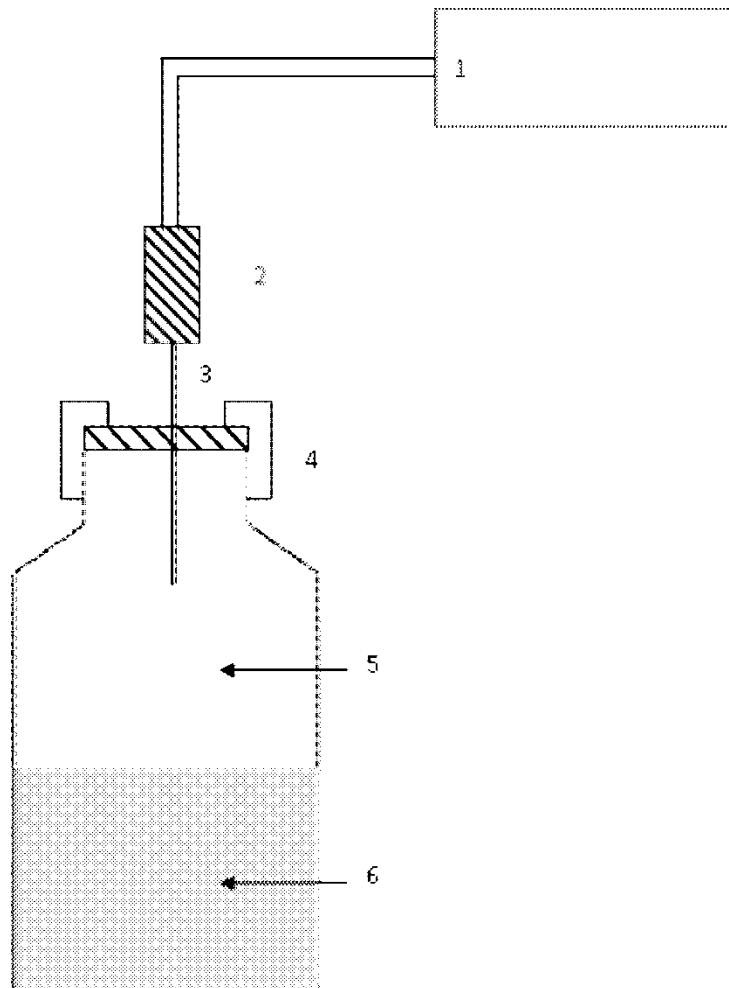
- 1) Kafli C.11 í þessum viðauka. Activated Sludge, Respiration Inhibition Test.
- 2) Kafli C.43 í þessum viðauka: Anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge: method by measurement of gas production.
- 3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water 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*, 7, 58-70.
- 7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- 8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.
- 9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- 10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. *Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods*, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

- 11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 39 (12), 2007-2018.
 - 12) 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.
-

1. viðbætur

Dæmi um búnað til að mæla myndun lífgass með gasþrýstingi



Skýringar:

- 1 — Þrýstingsmælir
- 2 — Þrívirkur gasþéttur loki
- 3 — Sprautunál
- 4 — Gasþétt lok (krumpað lok og himna)
- 5 — Kollrúm
- 6 — Sáð úr seyru sem er brotin niður

Pröfunarilát í umhverfi með hitastigið $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

*2. viðbætur***Umreikningur af þrýstingsmælinum**

Hægt er að setja aflestur af þrýstingsmælinum í samhengi við gasrúmmál með því að nota staðalferli og reikna út frá því út rúmmál gass sem myndast á hvert g af þurri seyru á 48 klukkustundum. Þessi virknistuðull er notaður sem ein af viðmiðununum til að meta gildi prófunamiðurstaðna. Kvörðunarferillinn er gerður með því að sprauta þekktu magni af gasi við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ í sermiflöskur sem innihalda jafnmikið rúmmál af vatni og hvarfblöndu, V_R .

- Deiliskömmtum með V_R ml af vatni, sem er haldið við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, er deilt í fimm sermiflöskur. Flöskunum er lokað og þær settar í vatnsbað við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ í 1 klst til að jafnvægisstilla þær.
- Kveikt er á þrýstingsmælinum, hann látinn ná jafnvægi og stilltur á núll.
- Sprautunálinni er stungið gegnum lokið á einni flöskunni, lokinn opnaður og hafður opinn þangað til þrýstingsmælirinn sýnir núll og þá er lokanum lokað.
- Aðferðin er endurtekin við flöskurnar sem eftir eru.
- Í hverja flösku er dælt 1 ml af lofti við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Nálinni (á mælinum) er stungið gegnum lokið á einni flöskunni og þrýstingsaflesturinn látinn ná jafnvægi. Þrýstingurinn er skráður, lokinn opnaður og hafður opinn þangað til þrýstingsaflesturinn er núll og síðan er lokanum lokað.
- Aðferðin er endurtekin við flöskurnar sem eftir eru.
- Öll aðferðin er endurtekin og notaðir 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, og 50 ml af lofti.
- Umreikningsferillinn, þrýstingur (Pa) móti innsprautuðu gasrúmmáli (ml), er teiknaður. Svörun tækisins er línuleg á bilinu 0 Pa til 70 000 Pa, og 0 ml til 50 ml gasmyndunar.

3. viðbætur

Þættir sem vitað er um sem geta leitt til rangra niðurstaðnaa) *Gæði flöskutappanna*

Mismunandi tegundir af himnum á sermiflöskurnar eru fánlegar á almennum markaði; þéttleiki margra þeirra, þ.m.t. nútýlgúmmís, minnkar þegar stungið er í þær með nál við skilyrðin í þessari prófun. Stundum minnkar þrýstingurinn mjög hægt þegar búið er að stinga sprautunálinni gegnum himnuna. Mælt er með notkun á gasþéttri himnu til að komast hjá lekum (b-liður 12. liðar).

b) *Raki í sprautunálinni*

Stundum safnast raki fyrir í sprautunálinni og leiðslunni og hann kemur fram sem lítills háttar undirþrýstingur við aflestur. Til að lagfæra þetta er nálin fjarlægð, leiðslan hrist, þerruð með pappirspurrku og ný nál sett á (c-liður 12. liðar og 35. heimild).

c) *Súrefnismengun*

Aðferðum með loftfirrðum skilyrðum hættir til að vera gallaðar vegna súrefnismengunar sem getur valdið minni gasmyndun. Í þessari aðferð skal draga úr þessum möguleika með því að nota einungis loftfirrða tækni, þ.m.t. notkun á hanskakassa.

d) *Grófar næringarefnablöndur í seyrju*

Gasmyndun við loftfirrðar aðstæður og næmi seyrunnar verða fyrir áhrifum af næringarefnablöndunni sem flyst með sáðinu í prófunarflöskurnar. Seyra, sem er brotin niður, úr loftfirrðum niðurbrotstanki fyrir heimilisskólþ inniheldur oft þekktanleg efni, s.s. hár og plöntuleifar úr sellulósa, sem getur gert erfitt um vik að taka dæmigerð sýni. Með því að sigta seyruna er hægt að fjarlægja gróf óleysanleg efni sem gerir töku dæmigerðra sýna líklegri (16. liður).

e) *Rokgjörn prófunariðefni*

Rokgjörn prófunariðefni losna upp í kollrúm prófunarflasknanna. Þetta getur leitt til þess að eitthvað af prófunarefninu tapast úr kerfinu við loftun eftir þrýstingsmælingu sem gefur, ranglega, há EC₅₀-gildi. Hægt er að draga úr gallanum með því að velja heppilegt hlutfall milli kollrúmsumfangs og vökvarúmmáls og sleppa því að lofta eftir að þrýstingur hefur verið mældur (10. heimild).

f) *Ólínuleiki gasmyndunar*

Ef ferill meðaltals uppsafnaðrar gasmyndunar á móti tíma í ræktun er ekki u.þ.b. línulegur á 48 klukkustunda tímabilinu getur nákvæmni prófunarinnar orðið minni. Til að komast hjá þessu getur verið ráðlegt að nota niðurbrotsseyru af öðrum uppruna og/eða að auka styrk næringarefnablöndunnar-næringarseyðisins, gerkjarnans og glúkósans í prófuninni (29. liður).

4. viðbætur

Notkun á umhverfissýnum með lágum lífmassastyrk — loftfirrð eðja, set o.s.frv.

INNGANGUR

- A.1 Sértek virkni örvera (rúmmál gass sem myndast á hvert g af þurrefni) í loftfirrðri eðju, seti, jarðvegi o.s.frv., sem kemur fyrir í náttúrunni, er almennt miklu minni en í loftfirrði seyru úr skólpi. Sökum þess verður að breyta hluta af tilraunaskilyrðunum þegar mæla á hamlandi áhrif íðefna á þessi minna virku sýni. Að því er varðar þessi minna virku sýni eru tvenns konar almennar aðgerðir mögulegar:
- framkvæma breytta forprófun (25. liður) með óþynntu sýni af eðju, jarðvegi o.s.frv. við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ eða við það hitastig sem er á staðnum þar sem sýninu var safnað til að fá nákvæmari hermum (eins og í 1. hluta ISO 13 641)
 - eða gera prófunina með þynntri (1:100) seyru úr niðurbrotstanki til að líkja eftir þeirri litlu virkni sem reiknað er með í umhverfissýninu en viðhalda hitastiginu $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (eins og í 2. hluta ISO 13 641).
- A.2 Hægt er að ná valkosti a) með því að fylgja aðferðinni sem lýst er hér (jafngildir 1. hluta í ISO 13 641) en mikilvægt er að gera forprófun (25. liður) til að ákvarða kjörskilyrði nema þegar sé vitað um þau frá fyrri prófunum. Sýni úr eðju eða seti skal blandað vandlega, t.d. í blandara, og, ef nauðsyn krefur, þynnt með litlu magni af afloftuðu þynningarvatni (14. liður) svo það verði nógu þunnt til að hægt sé að færa það með pípettu með breiðum oddi eða mæliglasi. Ef talið er að það vanti næringarefni er hægt að skilja eðjusýnið í skilvindu (við loftfirrðar aðstæður) og leysa það upp aftur í ólífrænum miðli sem inniheldur gerkjarna (A.11)
- A.3 Valkostur b). Þessi líkir tiltölulega vel eftir lítilli virkni umhverfissýna en skortir háan styrk svifagna sem eru fyrir hendi í þessum sýnum. Hlutverk þessara föstu efna í hömlun er ekki þekkt en hugsanlegt er að efnahvörf verði milli prófunariðefnanna og efnisþátta eðjunnar sem og að prófunariðefnin ásogist á föstu efnin og það geti orðið til þess að minnka eiturhrif prófunariðefnisins.
- A.4 Hitastig er annar mikilvægur þáttur: til að ná nákvæmri hermum skal framkvæmda prófanir við sama hitastig og er á sýnatökusvæðinu því vitað er að mismunandi samfélög baktería, sem framleiða metan, eru virkar innan mismunandi hitasviða, þ.e.a.s. hitakærar ($\sim 30\text{--}35\text{ °C}$), miðlungshitakærar ($20\text{--}25\text{ °C}$) og kuldakærar ($< 20\text{ °C}$), og geta sýnt mismunandi hömlunarmynstur.
- A.5 Tímalengd. Í 1. hluta almennu prófunarinnar, þar sem notuð er óþynnt seyra, var gasmyndun alltaf nægileg í 2–4 daga en í 2. hluta, þar sem notuð er þynnt seyra (1:100), var gasmyndun, ef nokkur, aldrei nóg á þessu tímabili í hringprófuninni. Madsen o.fl. (1996) halda því fram í lýsingu á síðarnefndu prófuninni að gera skuli ráð fyrir a.m.k. 7 dögum í hana.

Prófun með lágum lífmassastyrk (valkostur b)

Gera skal eftirfarandi breytingar og lagfæringar, bæta við eða skipta út nokkrum liðum og undirliðum í meginmálinu.

- A.6 Viðbót við 6. lið: Meginregla prófunarinnar.
- „Hægt er að nota þessa tækni með þynntri (1:100) loftfirrðri seyru að hluta til að líkja eftir lítilli virkni eðju og sets. Ræktunarhitastigið má annað hvort vera 35 °C eða sama hitastig og á staðnum þar sem sýninu var safnað. Þar eð bakteríuvirknin er miklu minni en í óþynntu seyrunni skal lengja ræktunartímabilið í a.m.k. 7 daga.“
- A.7 Viðbót við a-lið 12. liðar:
- „ræktunarkassinn skal vera starfhæfur niður í hitastig sem nemur 15 °C .“

A.8 Aukaprófevni er bætt við eftir 13. lið:

„Fosfórsýra (H_3PO_4), 85% massi í vatni.“

A.9 Viðbót við lok 16. liðar:

„Í prófuninni er notaður endanlegur styrkur sem nemur $0,20 \pm 0,05$ g/l af heildarmagni þurrefna.“

A.10 17. liður. Prófunarnæringarefnablanda

Ekki skal nota þessa næringarefnablöndu heldur skipta henni út fyrir gerkjarna (sjá 17. lið, A.11, A.12, A.13).

A.11 Nota skal ólífrænan miðil, þ.m.t. snefilefni, til að þynna loftfirrða seyru og til hægðarauka er lífrænu næringarefnablöndunni, gerkjarna, bætt við þennan miðil.

Viðbót á eftir 17. lið:

„a) Ólífrænn prófunarmiðill með gerkjarna.

Hann er tilreiddur úr prófunarmiðli af tíföldum styrk (b-liður 17. liðar, A.12) með snefilefnalaun (c-liður 17. liðar, A.13). Notað er nýtt natríumsúlfíðónahýdrat (b-liður 17. liðar, A.12) eða það þvegið og þurrkað fyrir notkun til að tryggja að það hafi næga afoxunargetu. Ef prófunin er framkvæmd án þess að nota hansakassa (j-liður 12. liðar) skal auka styrk natríumsúlfíðs í stofnlausninni í 2 g/l (úr 1 g/l). Einnig er hægt að bæta við natríumsúlfíði úr viðeigandi stofnlausn gegnum himnuna á lokuðu prófunarflöskunum, þar eð þessi aðferð dregur úr áhættu á oxun, til að fá endanlegan styrk sem nemur 0,2 g/l. Að öðrum kosti er hægt að nota títan(III)sítrat (b-liður 17. liðar). Því er bætt við gegnum himnuna á lokuðum prófunarflöskum til að fá styrk sem nemur 0,8 mmól/l til 1,0 mmól/l. Títan(III) sítrat er mjög öflugt afoxunarefni með lítil eiturhrif og er tilreitt eins og hér segir: Leyst eru upp 2,94 g af þrínatríumsítratdihýdrati í 50 ml af súrefnislausu þynningarvatni (14. liður) (sem verða að 200 mmól/l lausn) og 5 ml af a títan(III)klóríðlausn (15 g/100 ml þynningarvatni) bætt við. Hlutleyst í pH-gildið $7 \pm 0,5$ með natríumkarbónati og deilt í viðeigandi sermiflösku við köfnunarefnisgasstreymi. Styrkur títan(III)sítrats í þessari stofnlausn er 164 mmól/l. Nota skal prófunarmiðilinn tafarlaust eða geyma við 4 °C, ekki lengur en 1 dag.

A.12 b) Prófunarmiðill af tíföldum styrk, tilreiddur með eftirfarandi:

vatnsfrítt kalíumtvívetnisfosfat (KH_2PO_4)	2,7 g
dínatríumvetnisfosfat (Na_2HPO_4)	4,4 g
(eða 11,2 g tólfvatnað	5,3 g
ammóníumklóríð (NH_4Cl)	
kalsíumklóríðdihýdrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
magnesiumklóríðhexahýdrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
járn(II)klóríðtetrahýdrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resasúrín (afoxunarvísir)	0,01 g
natríumsúlfíðónahýdrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(eða títan(III)sítrat) endanlegur styrkur	0,8 mmól/l til 1,0 mmól/l
snefilefnalaun (sjá c-lið 17. liðar, A.13)	10,0 ml
gerkjarni	100 g
Leyst upp í þynningarvatni (14. liður) og fyllt upp að:	1000 ml

A.13 c) Snefilefnalaun, tilreidd með eftirfarandi:

mangan(II)klóríðtetrahýdrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
ortóbórsýra (H_3BO_3)	0,05 g

sinkklóríð ($ZnCl_2$)	0,05 g
kopar(II)klóríð ($CuCl_2$)	0,03 g
natríummólýbdatdíhýdrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
kóbalt(II)klóríðhexahýdrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
nikkel(II)klóríðhexahýdrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
dínatríumselenít (Na_2SeO_3)	0,05 g
Leyst upp í þynningarvatni (14. liður) og fyllt upp að:	1000 ml.“

A.14 25. liður: Forprófun

Mikilvægt er að forprófun sé gerð, eins og lýst er í 24. lið, að því undanskildu að styrkur fastra efna í seyrku skal vera 1:100 af því sem gefið er upp, þ.e.a.s. 0,1 g/l, 0,2 g/l og 0,4 g/l. Lengd ræktunartímabilsins skal vera a.m.k. 7 dagar.

Athugasemd: Í hringprófuninni (5. heimild) var kollrúmsumfangið allt of mikið, 75% af heildarrúmmálinu; það skal vera á ráðlögðu bili sem nemur 10–40%. Viðeigandi viðmiðun er sú að rúmmál gass sem myndast við u.þ.b. 80% hömlun ætti að vera mælanlegt með viðunandi nákvæmni (t.d. $\pm 5\%$ til $\pm 10\%$).

A.15 26. til 30. liður: Prófunariðefni, sáði og næringarefnablöndu bætt við.

Viðbótin er framkvæmd á sama hátt og lýst er í þessum liðum en næringarefnalausninni (17. liður) er skipt út fyrir prófunarmiðil ásamt gerkjarna (A.11).

Endanlegur styrkur þurra fastra efna í seyrnunni er einnig minnkaður úr 2 g/l–4 g/l í $0,2 \pm 0,05$ g/l (A.9). Tvö dæmi um viðbót efnispátta í prófunarblönduna eru gefin í töflu A.1 sem kemur í stað töflunnar í 29. lið.

A.16 33. liður: Ræktun í flöskum

Sökum þess að búist er við minni gasmyndunarhraða er ræktuninni haldið áfram í a.m.k. 7 daga.

A.17 34. liður: Þrýstingsmælingar

Ef þörf er á að tilgreina magnið í gasfasanum er notuð sama aðferð til að mæla þrýstinginn í kollrúminu á flöskunum og lýst er í 34. lið. Ef mæla á heildarmagn koltvísýrings (CO_2) ásamt metani (CH_4) er sýrustig fljótandi fasans lækkað u.þ.b. niður í pH-gildið 2 með því að sprauta fosfórsýru (H_3PO_4) í hverja viðkomandi flösku og mæla þrýstinginn eftir 30 mínútna hristing við prófunarhitastigið. Þó geta fengist meiri upplýsingar um gæði sáðsins með því að mæla þrýstinginn í hverri flösku fyrir og eftir sýringu. Þegar hraði koltvísýringsmyndunar er t.d. mikið meiri en metanmyndunar getur prófunariðefnið breytt næmi gerjunarbakteriunnar og/eða áhrifin verða helst á metanmyndandi bakteriuna.

A.18 18. liður: Mæling sýrustigs

Ef nota á fosfórsýru (H_3PO_4) þarf að setja aukaflokkur sérstaklega upp fyrir sýrustigsmælinguna án þess að bæta fosfórsýru í þær.

HEIMILD:

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.

Táfla A.1

Dæmi um uppsetningu prófunar fyrir prófunarlotur

Innihaldsefni hvarfblandna	1. dæmi	2. dæmi	Venjuleg röð viðbótar
Styrkur tilreidds sáðs (g/l)	0,42	2,1	—
Rúmmál sáðs sem bætt er við (ml)	45	9	4
Styrkur sáðs í prófunarflöskum (g/l)	0,20	0,20	—
Rúmmál prófunarmiðils sem bætt er við (ml)	9	9	2
Rúmmál þynningarvatns sem bætt er við (ml)	36	72	3
Styrkur gerkjarna í prófunarflöskum (g/l)	9,7	9,7	—
Rúmmál stofnlausnar prófunariðefnis (ml)	3	3	1
Heildarrúmmál vökva (ml)	93	93	—

*5. viðbætur***Skilgreiningar**

Í þessari prófunaraðferð eru notaðar eftirfarandi skilgreiningar:

Íðefni er efni eða blanda.

Prófunariðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

C.35 PRÓFUN Á EITURHRIFUM Á BLÓÐMAÐKA Í SETI OG VATNI MEÐ NOTKUN Á ÍBÆTTU SETI

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 225 um prófanir (2007). Dýr sem búa í lagarbotnum (*e. endobenthic*) og láta set ofan í sig geta orðið fyrir miklum váhrifum af íðefnum sem bindast seti og því ætti að setja í forgang að huga að þeim, t.d. 1.–3. heimild. Á meðal þeirra dýra sem láta set ofan í sig gegna lagaránar mikilvægu hlutverki í seti lagarkerfa. Með lífhreyfð í seti og sem bráð geta þessi dýr haft mikil áhrif á lífaðgengi slíkra íðefna að öðrum lífverum, t.d. fiska sem nærast á botndýrum. Ólíkt grunnsævislífverum grafa lagaránar í botnum sig niður í setið og láta ofan í sig setagnir undir yfirborði setsins (t.d. *Lumbriculus variegatus*, blóðmaðkar). Þetta tryggir að prófunarlífverurnar verða fyrir váhrifum frá prófunariðefninu með öllum hugsanlegum upptökuleiðum (t.d. snertingu við mengaðar setagnir og inntöku á þeim en einnig með gropuvatni og yfirliggjandi vatni).
2. Þessi prófunaraðferð er ætluð til að meta áhrif langvarandi váhrifa íðefna sem tengjast seti á blóðmaðkana *Lumbriculus variegatus* (Müller) sem búa í botnum. Hún byggist á fyrirliggjandi aðferðarlýsingum prófana á eiturrifum í seti og uppsöfnun í lífverum, t.d. 3.–10. heimild. Aðferðinni er lýst fyrir prófun við kyrrstöðuskilyrði. Í þessari prófunaraðferð er notuð sú sviðsmynd af váhrifum að bæta prófunariðefninu í setið. Notkun á íbættu seti er ætlað að líkja eftir seti sem er mengað af prófunariðefninu.
3. Íðefni sem þarf að prófa gagnvart lífverum sem búa í seti er yfirleitt þrávirkt í þessu hólfi í langan tíma. Lífverur sem búa í seti geta orðið fyrir váhrifum eftir mörgum leiðum. Hlutfallslegt mikilvægi hvorrar váhrifaleiðar og sá tími sem það tekur fyrir hverja þeirra að stuðla að heildareiturrifum er háð eðlisefnafræðilegum eiginleikum viðkomandi íðefnis og endanlegum afdrifum þess í dýrinu. Að því er varðar mjög ásogandi íðefni (t.d. með $K_{ow} > 5$) eða íðefni sem eru tengd setinu með samgildum tengjum getur inntaka á mengaðri fæðu verið mikilvæg váhrifaleið. Til þess að eiturrif slíkra íðefna séu ekki vanmetin er föðri, sem er nauðsynlegt til að prófunarlífverurnar æxlist og vaxi, bætt í setið áður en prófunariðefnið er sett í (11. heimild). Prófunaraðferðin, sem lýst er, er nægilega nákvæm til að hægt sé að framkvæma prófunina en jafnframt er svigrúm fyrir aðlögun á tilraunatilhöguninni með hliðsjón af skilyrðum á tilteknum rannsóknarstofum og mismunandi eiginleikum prófunariðefna.
4. Prófunaraðferðin miðar að því að ákvarða áhrif prófunariðefnis á æxlun og lífmassa prófunarlífveranna. Mældar líffræðilegar breytur eru heildarfjöldi eftirlifandi orma og lífmassi (þurrvig) við lok váhrifanna. Þessi gögn eru greind, annað hvort með því að nota aðhvarfslíkan til að meta styrk sem veldur x% áhrifum (t.d. EC₅₀, EC₂₅, og EC₁₀) eða með því að nota tölfraðilega tilgátuprófun til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) og minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC).
5. Í kafla C.27 í þessum viðauka, „Prófun á eiturrifum á mýlflugulirfum í seti og vatni með notkun á íbættu seti“ (6. heimild) er að finna margar nauðsynlegar og nytsamlegar upplýsingar um framkvæmd þessarar aðferðar til prófunar á eiturrifum í seti. Nauðsynlegar breytingar til að framkvæma prófanir á eiturrifum í seti með blóðmökum voru því unnar á grundvelli þess skjals. Önnur skjöl sem vísað til eru t.d. „ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates“ (3. heimild), „U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates“ (7. heimild), og „ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates“ (12. heimild). Auk þess veittu hagnýt reynsla, sem fékkst við hringprófanir á prófunaraðferðinni (13. heimild, hringprófunarskýrsla), og upplýsingar úr heimildum mikilvægar upplýsingar við samantekt þessa skjals.

FORSENDUR OG LEIÐBEINANDI UPPLÝSINGAR

6. Afla skal upplýsinga um prófunariðefnið, s.s. varúðarráðstafanir, viðeigandi geymsluskilyrði og greiningaraðferðir, áður en rannsókn hefst. Leiðbeiningar um prófun á íðefnum sem hafa eðlisefnafræðilega eiginleika sem gerir erfitt um vik að framkvæma prófunina eru í (14. heimild).

7. Áður en prófun er gerð skulu eftirfarandi upplýsingar um prófunariðefnið vera þekktar:
 - almennt heiti, efnaheiti (helst IUPAC-heiti), byggingarformúla, CAS-skráningarnúmer, hreinleiki,
 - gufuþrýstingur,
 - vatnsleysni.
8. Eftirfarandi viðbótarupplýsingar teljast gagnlegar áður en prófunin hefst:
 - deilistuðull oktanóls og vatns, K_{ow} ,
 - deilistuðull lífræns kolefnis og vatns, gefinn upp sem K_{oc} ,
 - vatnsrof,
 - ljósummyndun í vatni,
 - lífbrjótanleiki,
 - yfirborðsspenna.
9. Afla skal upplýsinga um tiltekna eiginleika setsins sem á að nota áður en prófunin hefst (7. heimild). Sjá nánar í 22.–25. lið.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

10. Ormar í svipuðu lífeðlisfræðilegu ástandi (sambæfðir eins og lýst er í 5. viðbæti) eru látnir verða fyrir váhrifum af eiturefni í röð styrkleika sem bætt er í setfasa set- og vatnskerfis. Nota skal gerviset og endurgert vatn sem miðil. Prófunarilát án viðbættis prófunariðefnis gegna hlutverki samanburðar. Prófunariðefnið er sett í setið í lausri vigt fyrir hvert styrkleikastig til að lágmarka breytileika milli samhliða prófana fyrir hvert styrkleikastig og síðan eru prófunarlífverurnar settar í prófunarilátin þar sem búið er að láta styrk setsins og vatnsins ná jafnvægi (sjá 29. lið). Tilraunadýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá set- og vatnskerfinu í 28 daga. Í ljósi þess að næringarefnainnihald gervisetsins er lítið skal bæta setið með föðurgjafa (sjá 22.–23. lið og 4. viðbæti) til að tryggja að ormarnir vaxi og æxlist við stýrð skilyrði. Á þennan hátt er tryggt að tilraunadýrin verði fyrir váhrifum af vatni og seti sem og af föðrinu.
11. Ákjósanlegasti endapunkturinn í þessari tegund rannsóknar er EC_x (t.d. EC_{50} , EC_{25} og EC_{10} ; hrifstyrkur sem hefur áhrif á x% af prófunarlífverunum) að því er varðar æxlun annars vegar og lífmassa hins vegar, samanborið við samanburðarsýnið. Þó skal veita því athygli að lítið er á EC_{50} sem traustasta endapunktinn vegna hinnar miklu óvissu sem tengist lágu EC_x (t.d. EC_{10} , EC_{25}) með óhemjuhá 95% öryggismörk (t.d. 15. heimild) og tölfræðilegan styrk sem er reiknaður út meðan á tilgátuprófun stendur. Auk þess er hægt að reikna út styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif og minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif fyrir lífmassa og æxlun ef tilhögun prófunar og gögn styðja þessa útreikninga (sjá 34.–38. lið). Tilgangurinn með rannsókninni, að leida út EC_x eða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif, mun ákvarða tilhögun prófunarinnar.

VIÐMIÐUNARPRÓFUN

12. Búið er við að frammistaða viðmiðunarlífveranna sýni nægilega vel fram á hæfni rannsóknarstofu til að framkvæma prófunina og, ef söguleg gögn eru fyrirleggjandi, endurtekningarnákvæmni prófunarinnar. Auk þess er hægt að framkvæma viðmiðunareiturhrifaprófanir með reglulegu millibili með viðmiðunareiturefni til að meta næmi prófunarlífveranna. Með 96 klst. viðmiðunarprófun á eiturhrifum í vatni eingöngu er hægt að sýna á fullnægjandi hátt fram á næmi og ástand tilraunadýranna (4. og 7. heimild). Upplýsingar um eiturhrif pentaklórfenóls (PCP) í fullgerðum prófunum (28 daga váhrif frá íbættu seti) eru teknar með í 6. viðbæti og í skýrslunni um hringprófunina á prófunaraðferðinni (13. heimild). Bráðum eiturhrifum pentaklórfenóls, í vatni eingöngu, er t.d. lýst í (16. heimild). Þessar upplýsingar er hægt að nota til að bera saman næmi prófunarlífvera í viðmiðunarprófunum með pentaklórfenól sem viðmiðunareiturefni. Mælt hefur verið með kalíumklóríði (KCl) eða koparsúlfati ($CuSO_4$) sem viðmiðunareiturefni fyrir *L. variegatus* (4.–7. heimild). Til þessa hefur reynt erfitt að fastsetja gæðaviðmiðun, byggða á gögnum um eiturhrif varðandi kalíumklóríð, vegna skorts á gögnum úr fræðiritum um *L. variegatus*. Hægt er að finna upplýsingar um eiturhrif kopars á *L. variegatus* í (17.–21. heimild).

GILDI PRÓFUNARINNAR

13. Til að prófunin teljist gild skal hún uppfylla eftirfarandi kröfur:

- Hringprófun (13. heimild) hefur sýnt að því er varðar blóðmaðka ætti meðalfjöldi lifandi orma í hverri samhlíða prófun í samanburðinum að hafa aukist um stuðul sem nemur a.m.k. 1,8 við lok váhrifanna, samanborið við fjölda í hverri samhlíða prófun við upphaf váhrifanna.
- pH-gildi yfirliggjandi vatns skal vera á bilinu 6–9 í allri prófuninni.
- Súrefnisstyrkur í yfirliggjandi vatni skal ekki vera undir 30% af metunargildi lofts við prófunarhitastig meðan á prófuninni stendur.

LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Prófunarkerfi

14. Mælt er með kyrrstöðukerfum án endurnýjunar á yfirliggjandi vatni. Ef hlutfall sets og vatns (sjá 15. lið) er hæfilegt nægir yfirleitt að lofta varlega til að vatnsgæðin haldist innan viðunandi marka fyrir prófunarlífverurnar (t.d. hámarka gildi uppleysts súrefnis, lágmarka uppsöfnun úrgangsefna). Einungis skal nota hálfkyrrstöðu- eða gegnumstreymiskerfi með ósamfelldri eða samfelldri endurnýjun á yfirliggjandi vatni í undantekningartilvikum því gert er ráð fyrir að regluleg endurnýjun á yfirliggjandi vatni hafi áhrif á íðefnajafnvægið (t.d. tap prófunariðefnis úr prófunarkerfinu).

Prófunarílát og búnaður

15. Láta skal váhrifin verða í bikarglössum úr gleri, t.d. 250 ml og 6 cm í þvermál. Hægt er að nota önnur hentug glerílát en tryggt skal að dýpt yfirliggjandi vatns og sets sé hæfileg. Setja skal u.þ.b. 1,5–3 cm þykkt lag af samsettu seti í hvert ílát. Hlutfallið milli dýptar setlagsins og dýptar yfirliggjandi vatns skal vera 1:4. Ílátin skulu vera af hæfilegri stærð miðað við hleðsluhlutfallið, þ.e. fjölda prófunarorma sem bætt er í á hverja þyngdareiningu af seti (sjá einnig 39. lið).
16. Prófunarílát og annar búnaður sem kemst í snertingu við prófunariðefnið skulu eingöngu vera úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Að því er varðar alla hluta búnaðarins skal forðast að nota efni sem kunna að leysast upp, ásoga prófunariðefnin eða leka öðrum íðefnum og hafa skaðleg áhrif á tilraunadýrin. Nota skal pólýtetraflúoretýlen, ryðfrítt stál og/öðru gler í allan búnað sem kemst í snertingu við prófunarmiðilinn. Að því er varðar lífræn íðefni, sem vitað er að ádagast á gler, getur verið nauðsynlegt að nota sílanhúðað gler. Í slíkum tilvikum verður að flegja búnaðinum að lokinni notkun.

Prófunartegund

17. Prófunartegundin sem er notuð í þessari tegund rannsóknar er ferskvatnsáninn *Lumbriculus variegatus* (Müller). Þessi tegund þolir ýmsar tegundir sets og er mikið notuð í prófunum á eiturhrif í seti og uppsöfnun í lífverum (t.d. 3., 5., 7., 9., 13., 15.–16., 22.–35. heimild). Greina skal frá uppruna tilraunadýranna, staðfestri sanngreiningu á tegundum (t.d. 36. heimild) sem og ræktunarskilyrðum. Ekki er krafist sanngreiningar á tegundum fyrir hverja prófun ef lífverurnar koma úr innanhússræktun.

Ræktun prófunarlífvera

18. Til að hafa nægilega marga orma til að framkvæma prófanir á eiturhrifum í seti er gagnlegt að geyma ormana í varanlegri rannsóknarstofuræktun. Leiðbeiningar um rannsóknarstofuræktunaraðferðir fyrir blóðmaðka og uppsprettur frumrækta er að finna í 5. viðbæti. Sjá nánari upplýsingar um ræktun þessara tegunda í (3., 7. og 27. heimild).
19. Til að tryggja að prófanirnar séu framkvæmdar með dýrum af sömu tegund er eindregið mælt með því að koma á fót ræktun með einni tegund. Ganga skal úr skugga um að ræktanir og einkum ormarnir sem eru notaðir í prófanirnar séu laus við sjáanlega sjúkdóma og afbrigðileika.

Vatn

20. Mælt er með að nota endurgert vatn samkvæmt kafla C.1 í þessum viðauka (37. heimild) sem yfirliggjandi vatn í prófununum; einnig er hægt að nota það til rannsóknarstofuræktana á ormunum (sjá 2. viðbæti vegna undirbúnings). Hægt er að nota náttúrulegt vatn er nauðsyn krefur. Vatnið sem valið er skal vera af þeim gæðum að prófunarlífverurmar geti vaxið og fjölgað sér meðan aðlögunar- og prófunartími stendur yfir án þess að fram komi nein óeðlileg einkenni í útliti eða atferli. Sýnt hefur verið fram á að blóðmaðkar lifa, vaxa og æxlast í þessari tegund vatns (30. heimild) og að hámarksstöðlun prófunar- og ræktunarskilyrða næst. Ef endurgert vatn er notað skal greina frá samsetningu þess og lýsa eiginleikum vatnsins fyrir notkun, a.m.k. að því er varðar sýrustig, súrefnisinnihald og hörku (gefið upp sem mg CaCO₃/l). Greining á vatninu fyrir notkun m.t.t. mengandi efna í snefilmagni gæti veitt gagnlegar upplýsingar (sjá t.d. 3. viðbæti).
21. pH-gildi yfirliggjandi vatns skal vera á bilinu 6,0–9,0 (sjá 13. lið). Ef búist er við aukinni ammoníakmyndun telst gagnlegt að halda pH-gildinu á bilinu 6,0–8,0. Við prófanir á t.d. daufum lífrænum sýrum er ráðlegt að stilla sýrustigið með því að jafna vatnið sem á að nota í prófuninni eins og er t.d. lýst í 16. heimild. Heildarharka vatnsins sem á að nota í prófuninni ætti að vera á bilinu 90–300 mg CaCO₃ á hvern lítra náttúrulegs vatns. Í 3. viðbæti eru teknar saman viðbótarviðmiðanir um viðunandi þynningarvatn samkvæmt OECD-leiðbeiningum nr. 210 (38. heimild).

Set

22. Þar eð ómengað, náttúrulegt set af tilteknum uppruna stendur kannski ekki til boða allan ársins hring og lífverur sem eru upprunnar í því sem og tilvist örmengunarefna geta haft áhrif á prófunina er mælt með notkun á samsettu seti (einnig nefnt endurgert set, gerviset eða tilbúið set). Notkun á samsettu seti lágmarkar breytileika prófunarskilyrða sem og aðflutning á dýrum sem eiga þar náttúruleg heimkynni. Eftirfarandi samsett set grundvallast á gerviseti skv. 6. og 39.–40. heimild. Mælt er með því til notkunar í þessa tegund prófunar (6., 10., 30. og 41.–43. heimild):
- a) 4–5% (þurrvig) mosamór – mikilvægt er að nota mó í duftformi – niðurbrot „í meðallagi“, finmalaður (kornastærð ≤ 0,5 mm) og einungis loftþurrkaður.
 - b) 20 ± 1% (þurrvig) kaólinleir (kaólíníttinnihald helst yfir 30%).
 - c) 75–76% (þurrvig) kvarssandur (finn sandur, kornastærð: ≤ 2 mm en > 50% af ögnunum skal vera á bilinu 50–200 µm).
 - d) Afjónað vatn, 30–50% af þurrvig setsins til viðbótar við efnisþætti þurrs sets.
 - e) Kalsíumkarbónati af efnafræðilegum hreinleika (CaCO₃) er bætt við til að stilla sýrustigið í lokablöndu setsins.
 - f) Heildarmagn lífræns kolefnis í lokablöndunni skal vera 2% (± 0,5%) af þurrvig setsins og skal stillt með því að nota viðeigandi magn af mó og sandi, í samræmi við a- og c-lið.
 - g) Fóður, t.d. lauf af brenninetlu í duftformi (*Urtica* sp., í samræmi við lyfjafraeðistaðla, til manneldis), eða blanda af laufi *Urtica* sp. í duftformi með alfa-sellulósa (1:1), 0,4–0,5% af seti (þurrvig) til viðbótar við þurra efnisþætti sets; sjá nánari upplýsingar í 4. viðbæti.
23. Uppspretta mós, kaólinleirs, föðurefnis og sands skal þekkt. Auk g-liðar eru talin upp í kafla C.27 í þessum viðauka (6. heimild) önnur plöntuefni til að nota sem uppsprettu næringar: þurrkuð lauf mórberjarunna (*Morus alba*), hvítmára (*Trifolium repens*), spinats (*Spinacia oleracea*) eða grös korns.
24. Völdum fódurgjafa skal bætt við áður en prófunariðefninu er bætt í setið eða meðan á því stendur. Valinn fódurgjafi skal a.m.k. gefa kost á ásættanlegri æxlun í samanburðarhópunum. Greining á gervisetinu eða efnisþáttum þess fyrir notkun m.t.t. örmengunarefna gæti veitt gagnlegar upplýsingar. Dæmi um tilreiðslu á

samsettu seti er lýst í 4. viðbæti. Blöndun á þurrum innihaldsefnum er einnig ásættanleg ef sýnt er fram á að innihaldsefnið í setinu skilji sig ekki eftir að yfirliggjandi vatni er bætt við (t.d. fljótandi móagnir) og að mórinn eða setið sé nægilega undirbúið (sjá einnig 25. lið og 4. viðbæti). Lýsa skal eiginleikum gervisetsins, a.m.k. eftir uppruna innihaldsefnanna, dreifingu kornastærðar (hundraðshlutfall af sandi, silti og leir), heildarmagni lífræns kolefnis, vatnsinnihaldi og sýrustigi. Mæling á möguleika á afoxun/oxun er valkvæð.

25. Ef þörf krefur, t.d. vegna tiltekinn tilgangs með prófun, getur náttúrulegt set frá ómenguðum stöðum einnig gegnt hlutverki prófunar- og/edá ræktunarsets (3. heimild). Ef náttúrulegt set er notað skal þó lýsa eiginleikum þess, a.m.k. eftir uppruna (söfnunarstaður), sýrustigi og ammoníaki í gropuvatninu, heildarmagni lífræns kolefnis og köfnunarefnisinnihaldi, dreifingu kornastærðar (hundraðshlutfall af sandi, silti og leir) og hundraðshlutfalli af vatnsinnihaldi (7. heimild) og það skal vera laust við hvers kyns mengun og aðrar lífverur sem kunna að keppa við prófunarlífverurnar eða hafa þær að bráð. Mæling á möguleika á afoxun/oxun og plúsjónaskiptagetu er valkvæð. Einnig er mælt með því að áður en prófunariðefni er bætt í náttúrulegt set sé það undirbúið í sjö daga við sömu skilyrði og verða síðan ríkjandi í prófuninni. Við lok þessa undirbúningstímabils skal fjarlægja yfirliggjandi vatn og fleygja því.
26. Set sem er notað skal vera af þeim gæðum að prófunarlífverurnar geti lifað og fjölgað sér meðan váhrífátímabilið stendur yfir án þess að fram komi nein óeðlileg einkenni í útliti eða atferli. Samanburðarormarnir eiga að grafa sig í setið og láta það ofan í sig. Æxlun í samanburðarhópnum skal a.m.k. vera samkvæmt gildisviðmiðunum sem lýst er í 13. lið. Skrá skal hvort saurkúlur, sem benda til þess að ormarnir láti setið ofan í sig, eru til staðar á yfirborði setsins eða ekki og þetta getur hjálpað til við túlkun á prófunarniðurstöðum að því er varðar váhrífaleiðir. Hægt er að fá viðbótarupplýsingar um inntöku á seti með því að nota aðferðirnar sem lýst er í 24.–25. og 44.–45. heimild þar sem inntaka prófunarlífveranna á seti eða val á ögnum er tilgreint.
27. Aðferðum til að meðhöndla náttúrulegt set fyrir notkun í rannsóknarstofu er lýst í 3., 7. og 12. heimild. Tilreiðslu og geymslu á gervisetinu, sem mælt er með að sé notað í prófuninni á blóðmökum, er lýst í 4. viðbæti.

Prófunariðefnið sett í

28. Prófunariðefninu skal bætt í setið. Þar eð gert er ráð fyrir því að vatnsleysni flestra prófunariðefna sé lítil skal leysa þau upp í heppilegum lífrænum leysi (t.d. asetoni, n-hexani, sýklóhexani) í eins litlu magni og unnt er til að undirbúa stofnlausnina. Stofnlausnin skal þynnt með sama leysi til að tilreiða prófunarlausnirnar. Eiturhrif og rokgirmi leysisins og leysni prófunariðefnisins í leysinum sem er valinn skulu vera helsta viðmiðunin fyrir valinu á hentugu uppleysandi efni. Fyrir hvert styrkleikastig sem er valið skal nota sama rúmmál af samsvarandi lausn. Íbætingin í setið skal vera í lausri vigt fyrir öll styrkleikastigin til að lágmarka breytileikann á styrk prófunariðefnisins milli samhliða prófana. Hver prófunarlausnanna er síðan blönduð með kvarssandi eins og lýst er í 22. lið (t.d. 10 g af kvarssandi á hvert prófunarilát). Rúmmál sem nemur 0,20–0,25 ml á hvert g af sandi hefur reynt fullnægjandi til að gegnbleyta kvarssandinn alveg. Þar á eftir verður að láta leysinn gufa upp til fulls. Til að draga úr tapi á prófunariðefninu vegna meðuppgefunar (e. *co-evaporation*) (t.d. háð gufuþrýstingi íðefnisins) skal nota húðaða sandinn tafarlaust eftir þurrkun. Þurri sandurinn er blandaður með hæfilegu magni af samsettu seti af samsvarandi styrkleikastigi. Taka verður tillit til sandmagnsins sem er að finna í prófunariðefninu og sandblöndunni við tilreiðslu á setinu (þ.e. af þeim sökum skal nota minni sand við tilreiðslu á setinu). Helsti kosturinn við þessa aðferð er að svo til enginn leysir er settur í setið (7. heimild). Að öðrum kosti er hægt, t.d. að því er varðar set af vettvangi, að bæta prófunariðefninu við með íbætingu í þurraðan og fínalaðan hluta af setinu, eins og lýst er hér að framan varðandi kvarssandinn, eða með því að hræra prófunariðefnið í blautt set og láta síðan uppleysandi efni gufa upp, ef það er notað. Þess skal gætt að tryggja að prófunariðefninu, sem er bætt við setið, sé dreift vandlega og jafnt í setið. Ef nauðsyn krefur er hægt að greina undirsýni til að staðfesta markstyrkleikana í setinu og til að ákvarða einsleitni. Það getur einnig verið gagnlegt að greina undirsýni prófunarlausnanna til að staðfesta markstyrkleikana í setinu. Þar eð notaður er leysir til að húða kvarssandinn með prófunariðefninu skal nota samanburð með leysi sem er tilreiðdur með sama magni af leysi og prófunarsetin. Greina skal frá aðferðinni sem er notuð til íbætingar og ástæðum þess að tiltekin íbætingaraðferð, önnur en sú sem lýst er hér að framan, er valin. Hægt er að aðlaga íbætingaraðferðina að eðlisefnafæðilegum eiginleikum prófunariðefnisins, t.d. til að forðast tap vegna uppgefunar við íbætingu eða við að ná jafnvægi. Viðbótarleiðbeiningar um íbætingaraðferðir eru gefnar í „Environment Canada“ (1995) (46. heimild).

29. Um leið og búið er að tilreiða íbætt set, dreifa því í ílát samhliða prófana og fylla upp með prófunarvatni er æskilegt að prófunariðefnið geti skipst milli sets og vatnsfasans (t.d. 3., 7. og 9. heimild). Þetta skal helst gert við þau hita- og loftunarskilyrði sem notuð eru í prófuninni. Viðeigandi jafnvægistími er set- og efnasértækur og getur verið allt frá klukkustundum upp í nokkra daga og í sjaldgæfum tilvikum allt að nokkrum vikum (4–5 vikur) (t.d. 27. og 47. heimild). Í þessari prófun er ekki beðið eftir að jafnvægi náist en mælt er með jafnvægistíma á bilinu 48 klst. til 7 dagar. Þar með lágmarkast tíminn fyrir niðurbrot prófunariðefnisins. Hægt er að nota lengri tíma til að láta íbætta setið ná jafnvægi eða eldast, háð tilganginum með rannsókninni, t.d. ef það á að líkja eftir umhverfisastæðum.
30. Við lok þessa jafnvægistíma skal taka sýni úr a.m.k. yfirliggjandi vatni og seti í lausu, a.m.k. við hæsta styrk og við lægri styrk, til greiningar á styrk prófunariðefnisins. Þessar ákvarðanir með greiningum á prófunariðefninu ættu að gera það kleift að reikna út massajöfnuð og setja fram niðurstöður á grundvelli mældra upphafsstyrkleika. Sýnataka truflar yfirleitt set- og vatnskerfið eða eyðileggur það. Þess vegna er alla jafna ekki hægt að nota sömu samhliða prófanir fyrir sýnatöku úr seti og ormum. Setja þarf upp viðbótar „greiningar“ ílát af viðeigandi stærð sem eru meðhöndluð á sama hátt (þ.m.t. tilvist prófunarlífvera) en ekki notuð í líffræðilegar athuganir. Velja skal þá stærð fyrir ílátin sem gefur það magn af sýnum sem þarf fyrir greiningaraðferðina. Nánari upplýsingar um sýnatökur er að finna í 53. lið.

FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

Forprófun

31. Ef engar upplýsingar eru fáanlegar um eiturhrif prófunariðefnis á blóðmaðka getur verið gagnlegt að framkvæma fortíraun til að ákvarða styrkleikasviðið sem á að prófa í endanlegu prófuninni og til að prófunarskilyrðin í endanlegu prófuninni verði sem best. Í þessu skyni er notuð röð af mismunandi styrkleikum prófunariðefnisins með mikilli dreifingu. Ormarnir eru látnir verða fyrir váhrifum af hverjum styrk prófunariðefnisins yfir tímabil (t.d. 28 daga eins og í endanlegu prófuninni) sem gerir það kleift að meta viðeigandi prófunarstyrkleika; ekki er þörf á samhliða prófunum. Athuga skal og skrá það atferli ormana, t.d. ef þeir forðast setið, sem getur stafað af prófunariðefninu og/eða af setinu, meðan á forprófun stendur. Ekki skal gera forprófun með meiri styrk en 1000 mg/kg af þurrvigst sets.

Endanleg prófun

32. Í endanlegri prófun skal nota og velja a.m.k. fimm styrkleika, t.d. á grundvelli forprófunarinnar til að finna skammtastærðir (31. liður) og eins og lýst er í 35.–38. lið.
33. Til viðbótar við prófunarraðirnar er keyrð samanburðarprófun (sjá 36.–38. lið að því er varðar samhliða prófanir) sem inniheldur alla efnisþætti, að undanskildu prófunariðefninu. Ef notuð eru einhver uppleysandi efni við ísetningu prófunariðefnisins ætti það ekki hafa nein marktæk áhrif á prófunarlífverunna enda hafi verið sýnt fram á það með viðbótarsamanburði þar sem eingöngu er notaður leysir.

Tilhögun prófunar

34. Tilhögun prófunar tengist því að velja styrk prófana, fjölda þeirra og styrkbil, fjölda íláta við hvern styrk og fjölda orma sem settir eru í hvert ílát. Tilhögun fyrir mat á EC_x til að meta styrk sem hefur engin merktanleg áhrif og til að framkvæma markprófun, er lýst í 35.–38. lið.
35. Þeir styrkleikar sem eru notaðir í prófuninni skulu ná yfir hrifstyrkina (t.d. EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀) og styrksviðið sem verið er að kanna m.t.t. áhrifa prófunariðefnisins. Forðast skal að framreikna langt undir lægsta styrk, sem hefur áhrif á prófunarlífverunna, eða yfir hæsta styrk sem er prófaður. Ef slíkur framreikningur er gerður — í undantekningartilvikum — verður að skýra það til fulls í skýrslunni.

36. Ef meta á EC_x skal prófa a.m.k. fimm styrkleika og að lágmarki þrjú samhlíða sýni fyrir hvern styrk; mælt er með sex samhlíða sýnum fyrir samanburð eða — ef hann er notaður — samanburð með leysi til að bæta mat á breytileika samanburðarins. Í öllu falli er ráðlegt að nota nægilegan prófunarstyrk til að gefa færi á góðu mati með líkani. Stuðullinn milli mismunandi styrkleika skal ekki vera hærri en tveir (unnt er að gera undantekningar í tilvikum þar sem hallatala styrksvörunarferilsins er lág). Unnt er að fækka samhlíða prófunum við hverja meðhöndlun ef fjöldi prófunarstyrkleika með svörum á bilinu 5–95% er aukinn. Ef fjöldi samhlíða prófana er aukinn eða bilið milli prófunarstyrkleika minnkað hefur það tilhneigingu til að leiða til þrengra öryggisbils fyrir prófunina.
37. Ef meta á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif/styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif skal nota a.m.k. fimm prófunarstyrkleika með a.m.k. fjórum samhlíða prófunum (mælt er með sex samhlíða prófunum fyrir samanburð eða — ef hann er notaður — samanburð með leysi til að bæta mat á breytileika samanburðarins) og stuðullinn milli styrkleikanna skal ekki vera hærri en tveir. Í 6. viðbæti eru gefnar upplýsingar um þann tölfraðilega styrk sem tilgátuprófun í hringprófuninni á prófunaraðferðinni leiddi í ljós.
38. Framkvæma má markprófun (með því að nota einn prófunarstyrk og samanburð) ef ekki er búist við áhrifum upp að 1000 mg/kg af þurrvigst sets, (t.d. út frá forprófun til að finna skammtastærðir) eða ef prófun á einum styrk nægir til að staðfesta gildi, sem verið er að kanna, fyrir styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif. Í síðara tilvikinu skal gefa ítarlegan rökstuðning í prófunarskýrslunni fyrir vali á markstyrk. Tilgangurinn með markprófuninni er að framkvæma prófun við styrk sem er nægilega hár til að gera þeim sem taka ákvarðanir kleift að útiloka hugsanleg eiturhrif íðefnisins og mörkin eru sett við styrk sem ekki er búist við að komi fram við neinar kringumstæður. Mælt er með 1000 mg/kg (þurrvigst). Alla jafna er nauðsynlegt að gera a.m.k. sex samhlíða prófanir, bæði fyrir meðhöndlunar- og samanburðarprófanirnar. Í 6. viðbæti eru gefnar upplýsingar um þann tölfraðilega styrk sem tilgátuprófun í hringprófuninni á prófunaraðferðinni leiddi í ljós.

Váhrifaskilyrði

Prófunarlífverur

39. Prófunin er framkvæmd með a.m.k. 10 ornum fyrir hvert ílát samhlíða prófunar sem er notað til að ákvarða líffraðilegar breytur. Þessi fjöldi orma svarar til u.þ.b. 50–100 mg af blautum lífmassa. Ef gert er ráð fyrir að þurrinnihald nemi 17,1% (48. heimild) er þetta u.þ.b. 9–17 mg af þurrum lífmassa í hverju íláti. Í U.S. EPA (2000 (7. heimild)) er mælt með því að nota ekki hleðsluhlutfall yfir 1: 50 (þurr lífmassi: heildarmagn lífræns kolefnis). Að því er varðar samsetta setið, sem lýst er í 22. lið, svarar þetta til u.þ.b. 43 g af seti (þurrvigst) á hverja 10 orma með innihald heildarmagns lífræns kolefnis sem nemur 2,0% af þurru seti. Í tilvikum þar sem notaðir eru fleiri en 10 ormar í hvert íláti skal aðlaga magn af seti og yfirliggjandi vatni til samræmis við það.
40. Ormar, sem eru notaðir í prófun, skulu vera af sama uppruna og vera í svipuðu lífeðlisfræðilegu ástandi (sjá 5. viðbæti). Velja skal orma af svipaðri stærð (sjá 39. lið). Mælt er með því að undirsýni ormalotunnar eða -stofnsins séu vigtað fyrir prófunina til að áætla meðalþyngdina.
41. Ormar, sem notaðir eru í prófunina, eru teknir úr ræktuninni (sjá nánar í 5. viðbæti). Stór (fullvaxin) dýr, sem sýna engin merki um nýlega skiptingu, eru flutt í glerskálar (t.d. petrískálar) sem innihalda hreint vatn. Þau eru síðan samhæfð eins og lýst er í 5. viðbæti. Eftir endurvöxt í 10–14 daga skal nota í prófunina óskaddaða, heila orma af svipaðri stærð, sem synda eða skriða fjörlega eftir vægt líkamlegt áreiti. Ef prófunarskilyrðin eru frábrugðin ræktunarskilyrðunum (t.d. hitastig, birtufyrirkomulag og yfirliggjandi vatn) ætti aðlögunarfasi, t.d. í 24 klukkustundir við sama hitastig, birtufyrirkomulag og yfirliggjandi vatn og eru notuð í prófuninni, að nægja til að laga ormana að prófunarskilyrðunum. Setja skal aðlöguðu ánana af handahófi í prófunarilátin.

Fóðrun

42. Þar eð fóðri er bætt við setið fyrir ísetningu prófunariðefnisins (eða á meðan) fá ormarir ekki viðbótarfóður meðan á prófuninni stendur.

Ljós og hiti

43. Ljósloftan í ræktuninni og prófuninni er alla jafna 16 klukkustundir (3. og 7. heimild). Halda skal ljósstyrk lágum (t.d. 100–500 lx) til að líkja eftir náttúrulegum skilyrðum á yfirborði setsins og mæla það a.m.k. einu sinni meðan á váhrifátímabilinu stendur. Hitastigið skal vera $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ meðan prófunin stendur yfir. Munur á hitastigi milli prófunarilátanna má ekki fara yfir $\pm 1\text{ °C}$ á tilteknum mælingardegi. Setja skal prófunarilátin af handahófi í prófunarhitakassann eða á prófunarsvæðið, t.d. til að lágmarka bjögun á æxlun vegna staðsetningar íláts.

Lofun

44. Lofta skal yfirliggjandi vatnið í prófunarilátunum varlega (t.d. 2–4 bólur á sekúndu) með Pasteur-pípettu sem er staðsett u.þ.b. 2 cm ofan við yfirborð setsins til að lágmarka truflun í setinu. Þess skal gætt að styrkur uppleysts súrefnis falli ekki niður fyrir 30% af metnunargildi lofts. Loftbirgðum skal stjórnað og — ef nauðsyn krefur — þær aðlagðar a.m.k. einu sinni á dag á virkum dögum.

Mælingar á vatnsgæðum

45. Mæla skal eftirfarandi vatnsgæðabreytur í yfirliggjandi vatninu:

Hitastig:	a.m.k. í einu prófunaríláti fyrir hvert styrkleikastig og einu prófunaríláti fyrir samanburð einu sinni í viku og við upphaf og lok váhrifátímabilsins; ef unnt er má til viðbótar skrá hitastig í umhverfi þess (andrúmsloft eða vatnsbað), t.d. á klukkustundar fresti.
Innihald uppleysts súrefnis:	a.m.k. í einu prófunaríláti fyrir hvert styrkleikastig og einu prófunaríláti í samanburðinum einu sinni í viku og við upphaf og lok váhrifátímabilsins; gefið upp sem mg/l og metnunargildi lofts í %.
Loftbirgðir:	skulu athugaðar a.m.k. einu sinni á dag á virkum dögum og — ef nauðsyn krefur — aðlagðar.
Sýrustig:	a.m.k. í einu prófunaríláti fyrir hvert styrkleikastig og einu prófunaríláti í samanburðinum einu sinni í viku og við upphaf og lok váhrifátímabilsins.
Heildarharka vatns:	a.m.k. í einu íláti samhliða prófunar við samanburðarprófanirnar og í einu prófunaríláti við hæsta styrk við upphaf og lok váhrifátímabilsins; gefið upp sem mg/l CaCO ₃ .
Heildarammoniaksinnihald:	a.m.k. í einu íláti samhliða prófunar við samanburðarprófanirnar og í einu prófunaríláti fyrir hvert styrkleikastig við upphaf váhrifátímabilsins og síðan 3 × í viku; gefið upp sem mg/l NH ₄ ⁺ eða NH ₃ eða heildarmagn ammoníaks-N.

Ef mælingar á vatnsgæðabreytum krefjast þess að umtalsvert vatn sé tekið úr ílátunum í sýnum getur verið ráðlegt að setja upp aðskilin ílát fyrir mælingar á vatnsgæðum til að breyta ekki rúmmálshlutfalli vatns og sets.

Liffræðilegar athuganir

46. Meðan váhrifin standa yfir skal athuga prófunarilátin til að meta sjónrænt hvort um er að ræða einhverja breytingu á atferli ormannna (t.d. að þeir forðast setið, saurkúlur sjáanlegar á yfirborði setsins) miðað við samanburðinn. Athuganir skulu skráðar.

47. Hvert ílát samhliða prófunar er skoðað við lok prófunarinnar (hægt er að undanskilja viðbótarílát, sem ætluð eru fyrir efnagreiningar, skoðuninni). Nota skal viðeigandi aðferð til að endurheimta ormana úr prófunarílátinu. Þess skal gætt að allir ormarnir séu óskaddaðir þegar þeir eru endurheimtir. Ein möguleg aðferð er að sigta ormana frá setinu. Hægt er að nota net úr ryðfríu stáli með viðeigandi möskvastærð. Mestöllu yfirliggjandi vatninu er hellið varlega af og setið og vatnið sem eftir er hrist til að fá grugglausn sem hægt er að hella gegnum sigtið. Ef notuð er 500 µm möskvastærð fara flestar setagnirnar mjög fljótt gegnum það; þó skal sigta með hraði til að koma í veg fyrir að ormarnir skriði inn í möskvana eða gegnum þá. Ef notuð er 250 µm möskvastærð kemur það í veg fyrir að ormarnir skriði inn í möskvana eða gegnum þá; þó skal þess gætt að eins lítið af setögnunum og unnt er verði eftir í möskvunum. Hægt er að sía sigtuðu grugglausnina úr hverju íláti samhliða prófana í annað sinn til að tryggja að allir ormarnir endurheimtist. Staðgönguáðferð gæti verið sú að hita setið með því að setja prófunarílátin í vatnsbað við 50–60 °C; ormarnir fara úr setinu og hægt er að safna þeim af yfirborði setsins með eldsléttaðri (e. *fire polished*) pípettu með stóru opi. Önnur staðgönguáðferð gæti verið sú að mynda setgrugglausn og hella henni á grunnan bakka af hentugri stærð. Hægt er að tína ormana upp úr þunnu grugglausnarlaginu með stálprjóni eða tóng (sem er frekar notuð eins og gaffall en tóng til að forðast að skadda ormana) og flytja þá í hreint vatn. Eftir að ormarnir hafa verið aðskildir frá setgrugglausninni eru þeir skolaðir í prófunarmiðlinum og taldir.
48. Óháð aðferðinni sem er notuð skulu rannsóknarstofur sýna fram á að starfsfólk þeirra sé fært um að endurheimta að meðaltali a.m.k. 90% af lifverunum úr öllu setinu. Til dæmis er hægt að bæta tilteknum fjölda prófunarlifvera við í viðmiðunarset eða prófunarset og hægt að ákvarða endurheimt eftir 1 klst. (7. heimild).
49. Heildarfjöldi lifandi og dauðra einstaklinga í hverju íláti samhliða prófunar skal skráður og metinn. Ormar í eftirtöldum hópum teljast dauðir:
- sem sýna engin viðbrögð eftir varlegt, líkamlegt áreiti
 - sem sýna merki um rotnun (ásamt „a“)
 - sem finnast ekki
- Auk þess er hægt að flokka lifandi orma í einn af þremur hópum:
- stórir heilir ormar (fullvaxnir) án skrokkhluta sem hafa vaxið aftur
 - heilir ormar með endurvaxna skrokkhluta, ljósari á litinn, (t.d. með nýjan afturenda, nýjan framenda eða bæði aftur- og framenda)
 - ormar sem eru ekki heilir (t.d. nýskiptir ormar sem skrokkhlutinn hefur ekki vaxið á aftur)
- Þessar viðbótarathuganir eru ekki skylda en hægt er að nota þær til frekari túlkunar á líffræðilegum niðurstöðum (t.d. ef margir ormar eru settir í c-hóp getur það bent til þess að tiltekin meðhöndlun seinki æxlun eða endurvexti). Til viðbótar við þetta skal skrá ef einhver mismunur sést á útliti meðhöndlaðra orma og samanburðarorma (t.d. skemmdir á húð, bjúgur á skrokkhlutum).
50. Tafarlaust eftir talningu/mat eru lifandi ormar, sem fundust í hverju íláti, settir í þurrkaða, forvigtaða og merkta vigtunarbakka (einn fyrir hverja samhliða prófun) og aflifaðir með einum dropa af etanóli á hvern vigtunarbakka. Vigtunarbakkarnir eru settir í þurrkofn við 100 ± 5 °C til að þorna yfir nótt, eftir það eru þeir vegnir eftir kælingu í þurrkara og þurrvigt ormana ákvörðuð (helst í g með a.m.k. fjórum aukastöfum).
51. Til viðbótar við heildarþurrvigt er hægt að ákvarða þurrvigt án ösku eins og lýst er í (49. heimild) til að gera grein fyrir ólífrænum efnisþáttum sem koma úr innteknu seti sem er fyrir hendi í meltingarvegi ormana.
52. Lífmassinn er ákvarðaður sem heildarlífmassi á hvert ílát samhliða prófunar, þ.m.t. fullvaxnir ormar og ungir ormar. Ekki skal taka dauða orma með í reikninginn við ákvörðun á lífmassa á hvert ílát samhliða prófunar.

Sannprófun á styrk prófunariðefnis*Sýnataka*

53. Taka skal sýni til efnagreiningar á prófunariðefninu, a.m.k. við hæsta styrk og við lægri styrk, a.m.k. við lok jafnvægisfasans (áður en prófunarlífverunum er bætt í) og við lok prófunarinnar. Taka skal sýni til greiningar úr a.m.k. seti í lausu og yfirliggjandi vatni. Taka skal a.m.k. tvö sýni úr hverjum efnivið og hverju meðhöndlunarílati hverjum sýnatökudegi. Geyma má annað af sýnunum tveimur til vara (til greiningar ef t.d. upphafleg greining fellur utan við $\pm 20\%$ styrkbil frá nafnstyrk. Ef um er að ræða sértæka efnafræðilega eiginleika, t.d. ef búist er við hröðu niðurbroti prófunariðefnisins, er hægt að betrubæta greiningaráætlunina (t.d. tíðari sýnataka, greining á fleiri styrkleikastigum) á grundvelli sérfræðiálits. Þá er hægt að taka sýni á millistigsdagsetningum (t.d. á sjöunda degi eftir að váhrif hefjast).
54. Taka skal sýni úr yfirliggjandi vatni með því að hella varlega af því eða sjúga upp úr því til að lágmarka truflun í setinu. Skrá skal rúmmál sýnanna.
55. Eftir að yfirliggjandi vatn hefur verið fjarlægt skal gera setið einsleitt og flytja það í heppilegt ílát. Þyngd blauta setsýnisins er skráð.
56. Ef einnig er gerð krafa um greiningu á prófunariðefninu í gropuvatni skal skilja einsleitu og vigtuðu sýnin úr setinu í skilvindu til að fá gropuvatnið. Til dæmis er hægt að setja u.þ.b. 200 ml af blautu seti í 250 ml skiljunarglós. Eftir það skal skilja sýnin í skilvindu án síunar til að einangra gropuvatnið, t.d. við $10000 \pm 600 \times g$ í 30–60 mínútur við hitastig sem er ekki yfir hitastiginu sem er notað í prófuninni. Eftir skiljun er því sem flýtur ofan á hellt af eða það fjarlægt með pipettu, þess gætt að engar setagnir fylgi með og rúmmálið skráð. Þyngd setkúlunnar, sem eftir er, er skráð. Ef þurrvigts setsins er ákvörðuð á hverjum sýnatökudegi getur það auðveldað mat á massajöfnuði eða endurheimt prófunariðefnisins í vatns- og setkerfinu. Í sumum tilvikum er ef til vill ekki mögulegt að greina styrk í gropuvatni vegna þess að sýnið er of lítið.
57. Ef greining er ekki gerð strax skal geyma öll sýni með viðeigandi aðferð, t.d. við geymsluskilyrði sem mælt er með til að niðurbrot tiltekins prófunariðefnis sé í lágmarki (t.d. eru umhverfissýni yfirleitt geymd við -18 °C í myrkri). Afla skal upplýsinga um viðeigandi geymsluskilyrði fyrir tiltekið prófunariðefni — t.d. lengd og hitastig geymslu, útdráttaraðferðir o.s.frv. — áður en rannsóknin hefst.

Efnagreiningaraðferð

58. Þar eð öll aðferðin ræðst í meginatriðum af nákvæmni, samkvæmni og næmi þeirrar greiningaraðferðar sem er notuð fyrir prófunariðefnið skal kanna með tilraunum hvort samkvæmni og samanburðarnákvæmni efnagreiningarinnar, svo og endurheimt prófunariðefnisins úr vatns- og setsýnum, séu fullnægjandi að því er varðar viðkomandi aðferð, a.m.k. við lægsta og hæsta prófunarstyrk. Einnig skal ganga úr skugga um að prófunariðefnið sé ógreinanlegt í samanburðarkerjum í styrk sem er hærri en magngreiningarmörk. Nafnstyrkur endurheimtar í íbættum sýnum í gæðaeftirliti er leiðréttur, ef nauðsynlegt er (t.d. ef endurheimt er utan við 80–120% af íbættu magni). Öll sýni skulu meðhöndluð þannig meðan prófunin stendur yfir að mengun og tap séu í lágmarki (t.d. sem stafar af ásogi prófunariðefnisins á sýnatökubúnaðinn).
59. Gera skal grein fyrir og skrá endurheimt prófunariðefnisins, magngreiningarmörk og greiningarmörk í seti og vatni.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF*Úrvinnsla niðurstaðna*

60. Helstu skyldubundnu svarbreytur í prófuninni sem á að meta tölfræðilega eru lífmassi og heildarfjöldi orma í hverju ílati samhliða prófunar. Einnig er valkvætt að meta æxlun (sem aukningu á heildarfjölda orma) og vöxt (sem aukningu á þurru lífmassa). Í því tilviki skal leggja mat á þurrvigts orma við upphaf váhrifa, t.d. með mælingum á þurrvigti í dæmigerðu undirsýni úr lotu orma sem eru samhæfðir og á að nota í prófuninni.

61. Þó að dánartíðni sé ekki endapunktur þessarar prófunar skal meta dánartíðni eftir því sem unnt er. Við mat á dánartíðni skal líta á orma sem bregðast ekki við varlegu, líkamlegu áreiti eða sýna merki um rotnun, svo og týnda orma, sem dauða. Dánartíðni skal a.m.k. skráð og höfð í hug við túlkun á prófunarniðurstöðunum.
62. Hrifstyrkur skal gefinn upp í mg/kg af þurrvígt sets. Ef endurheimt prófunariðefnis, sem mælist í setinu eða í seti og yfirliggjandi vatni við upphaf váhrifa, er á bilinu 80–120% af nafnstyrk er hægt að gefa hrifstyrkina (EC_x , styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif, minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif) upp á grundvelli nafnstyrks. Ef endurheimt vikur meira frá nafnstyrk en sem nemur $\pm 20\%$ af nafnstyrknum skulu hrifstyrkirnir (EC_x , styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif, minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif) grundvallast á mældum upphafsstyrk við upphaf váhrifa, t.d. að teknu tilliti til massajöfnuðar prófunariðefnisins í prófunarkerfinu (sjá 30. lið). Í þessum tilvikum er hægt að fá viðbótarupplýsingar úr greiningu á stofn- og/eða notkunarlausnum til að staðfesta að prófunarsetið hafi verið tilreitt á réttan hátt.

EC_x

63. EC_x -gildi fyrir breytur, sem lýst er í 60. lið, eru reiknuð út með viðeigandi tölfræðiaðferðum (t.d. probit-greiningu, umhverfðri jöfnu eða Weibull-jöfnu, klipptri Spearman-Kärber-aðferð eða einföldum innreikningi). Leiðbeiningar um tölfræðilegt mat eru gefnar í (15. og 50. heimild). EC_x fæst með því að setja gildi, sem samsvarar $x\%$ af meðaltali samanburðarins, inn í jöfnuna sem fæst. Til að reikna út EC_{50} eða annan EC_x skulu meðalgildi hverrar meðhöndlunar (\times) sett í aðhvarfsgreiningu.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif

64. Ef tölfræðilegri greiningu er ætlað að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif er nauðsynlegt að nota tölfræðilegar upplýsingar um hvert ílát (lítið er á hvert stöku ílátanna sem samhliða prófun). Nota skal viðeigandi tölfræðiaðferðir. Skaðleg áhrif prófunarefnisins samanborið við samanburðarprófunina eru yfirleitt rannsökuð með því að nota einhliða (minni) tilgátuprófun við $p \leq 0,05$. Dæmi eru gefin í eftirfarandi liðum. Leiðbeiningar um val á viðeigandi tölfræðilegum aðferðum eru gefnar í (15. og 50. heimild).
65. Hægt er að prófa normaldreifingu gagna, t.d. með Kolmogorov-Smirnov-prófun á mátgæðum, prófun til að ákvarða hlutfall milli styrkbils og staðalfráviks (e. *Range-to-standard-deviation ratio test (R/s-test)*) eða Shapiro-Wilk-prófun (tvíhliða, $p \leq 0,05$). Hægt er að nota Cochran's-prófun, Levene-prófun eða Bartlett's-prófun (tvíhliða, $p \leq 0,05$) til að prófa einsleitni dreifni. Ef forsendur stikabundinna prófunaraðferða (normleiki, einsleitni dreifni) eru uppfylltar er hægt að framkvæma einhliða dreifnigreiningu (ANOVA) og síðan margfaldar samanburðarprófanir. Hægt er að nota parasamanburð (t.d. t-próf Dunnetts) eða leitniþrófun með stíglækkun (t.d. Williams-prófun) til að reikna út hvort það er marktækur munur ($p \leq 0,05$) á milli samanburðarins og hinna ýmsu styrkleika prófunarefnisins. Að öðrum kosti skal nota stikalausar aðferðir (t.d. Bonferroni-U-próf samkvæmt Holm eða Jonckheere-Terpstra-leitniþrófun) til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif og minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif.

Markprófun

66. Ef markprófun (samanburður á einungis einu samanburðarlíati og meðhöndlunarílati) hefur verið framkvæmd og forsendur stikabundinna prófunaraðferða (normleiki, einsleitni) eru uppfylltar er hægt að meta mælanlegar svaranir (heildarfjöldi orma og lífmassi sem þurrvígt orma) með t-prófi. Nota má t-prófun fyrir ójafna dreifni (Welch) eða stikalausar prófun, s.s. Mann-Whitney-U-prófun, ef þessar kröfur eru ekki uppfylltar. Í 6. viðbæti eru gefnar upplýsingar um þann tölfræðilega styrk sem tilgátuprófun í hringprófuninni á prófunaraðferðinni leiddi í ljós.
67. Til að ákvarða umtalsverðan mun milli samanburðarlátanna (samanburður og samanburður með leysi) er hægt að prófa samhliða prófanirnar fyrir hverja samanburðarprófun eins og lýst er fyrir markprófunina. Ef ekki greinist umtalsverður munur í þessum prófunum er hægt að hópa allar samanburðarprófanir og samhliða samanburðarprófanir með leysi. Að öðrum kosti skal bera öll meðhöndlunarílat saman við samanburðinn sem er með leysi.

Túlkun niðurstaðna

68. Niðurstöðurnar skulu túlkaðar með varúð ef vikið var frá þessari prófunaraðferð og ef mældur styrkur prófunarlausa er við gildi sem eru nálægt greiningarmörkum greiningaraðferðarinnar sem notuð er. Ef eitthvað er vikið frá þessari prófunaraðferð skal þess getið.

Prófunarskýrsla

69. Í prófunarskýrslunni skulu a.m.k. vera eftirtaldar upplýsingar:

— *Prófunariðefni:*

- efnafræðileg sanngreiningargögn (almennt heiti, efnaheiti, byggingarformúla, CAS-númer, o.s.frv.), þ.m.t. hreinleiki og greiningaraðferð til að magnákvæða prófunarefnið; uppruni prófunariðefnisins, auðkenni og styrkleiki allra leysa sem eru notaðir,
- allar tiltækar upplýsingar um eðliseiginleika og eðlisefnafræðilega eiginleika sem lágu fyrir áður en prófunin hófst, (t.d. vatnsleysni, gufuþrýstingur, deilistuðull í jarðvegi (eða í seti, ef hann liggur fyrir), log K_{ow} , stöðugleiki í vatni o.s.frv.).

— *Prófunartegund:*

- vísindaheiti, uppruni, hvers kyns formeðhöndlun, aðlögun, ræktunarskilyrði o.s.frv.

— *Prófunarskilyrði:*

- prófunaraðferð sem er notuð (t.d. kyrrstöðu-, hálfkyrrstöðuprófun eða gegnumstreymi),
- tilhögun prófunar (t.d. fjöldi, efni og stærð prófunarkerja, rúmmál vatns í hverju íláti, setmassi og -rúmmál í hverju íláti, (að því er varðar aðferðir með gegnumstreymi eða hálfkyrrstöðu: hve hratt er skipt um vatn), hvers kyns loftun sem er notuð fyrir prófunina og á meðan á henni stendur, fjöldi íláta fyrir samhliða prófanir, fjöldi orma á hvert ílát samhliða prófana við upphaf váhrifa, fjöldi prófunarstyrkleika, lengd aðlögunartíma, jafnvægistíma og váhrifatímabíla, tíðni sýnatöku),
- dýpt sets og yfirliggjandi vatns,
- aðferð við formeðhöndlun prófunariðefnis og íbætingu/notkun þess,
- nafngildi prófunarstyrks, upplýsingar um sýnatöku til efnagreiningar og þær greiningaraðferðir sem voru notaðar til að finna styrk prófunariðefnisins,
- eiginleikar sets eins og lýst er í 24.–25. lið og allar aðrar mælingar sem gerðar voru; tilreiðsla á samsettu seti,
- tilreiðsla á prófunarvatninu (ef endurgert vatn er notað) og eiginleikar (súrefnisstyrkur, sýrustig, leiðni, harka og allar aðrar mælingar sem gerðar voru) áður en prófunin hefst,
- ítarlegar upplýsingar um fôðrun ná yfir tegund fôðurs, tilreiðslu, magn og fôðrunarfyrirkomulag,
- ljósstyrkur og ljóslota eða -lotur,
- aðferðir sem eru notaðar til að ákvarða allar líffræðilegar breytur (t.d. sýnataka, skoðun, vigtun prófunarlífvera) og allar ólífrænar breytur (t.d. gæðabreytur vatns og sets),
- rúmmál og/eða þyngd allra sýna til efnagreininga,
- ítarlegar upplýsingar um meðhöndlun allra sýna til efnagreininga, þ.m.t. upplýsingar um tilreiðslu, geymslu, íbætingaraðferðir, útdrátt og greiningaraðferðir (og nákvæmni) varðandi prófunariðefnið og endurheimt prófunariðefnisins.

- *Niðurstöður:*
 - vatnsgæði í prófunarilátunum (sýrustig, hitastig, styrkur uppleysts súrefnis, harka, ammoniakstyrkur og allar aðrar mælingar sem gerðar voru),
 - heildarmagn lífræns kolefnis, hlutfall á milli þurrvigta og blautvigta, sýrustig setsins og allar aðrar mælingar sem gerðar voru,
 - heildarfjöldi og, ef hann er ákvarðaður, fjöldi heilla orma og orma sem ekki eru heilir í hverju prófunarkeri við lok prófunarinnar,
 - þurrvigt orma í hverju prófunarkeri við lok prófunarinnar og, ef hún er mæld, þurrvigt undirsýnis orma við upphaf prófunarinnar,
 - hvers kyns óeðlilegt atferli sem vart verður við, samanborið við samanburðarilátin (t.d. forðast set, saurkúlur eru fyrir hendi eða ekki),
 - öll dauð dýr sem vart verður við,
 - mat á endapunktum eitrunar, (t.d. EC₅₀, styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif og/eða minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif) og tölfraðiaðferðir sem eru notaðar til að ákvarða þá,
 - nafngildi prófunarstyrks, mældur prófunarstyrkur og niðurstöður úr öllum greiningum til að ákvarða styrk prófunariðefnisins í prófunarilátunum,
 - öll frávik frá gildisviðmiðunum.
- *Mat á niðurstöðum:*
 - fylgni niðurstaðna við gildisviðmiðanir sem eru tilgreindar í 13. lið,
 - umfjöllun um niðurstöðurnar, þ.m.t. öll áhrif sem frávik frá prófunaraðferðinni hafa á niðurstöðu prófunarinnar.

HEIMILDIR

- 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) Kaffi C.27 í þessum viðauka, „Prófun á eiturhrifum á myflugulirfum í seti og vatni með notkun á íbættu seti“.
- 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*, *Hyaella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 12(7):1261-1266.
- 21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.
- 22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- 23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.
- 24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

- 25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- 26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg, M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 292-302.
- 27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- 28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty, J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 872-885.
- 29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- 30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ¹⁴C-17 α -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59, 271-280.
- 31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000–2007.
- 32) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
- 33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- 34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 235/236: 407-414.
- 35) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- 36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22*.
- 37) Kafi C.1 í þessum viðauka, Prófun á bráðum eiturhrifum á fisk.
- 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) Martínez-Madrid, M., Rodríguez, P., Pérez-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.

Viðbótarheimildir um tölfræðiaðferðir:

- 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-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction: *Environ. Sci. Technol.* 12 (1998), 417.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Miller, R.G., Jr. (1986). *Beyond ANOVA, basics of applied statistics.* John Wiley & Sons. New York.
- Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.

*I. viðbætur***Skilgreiningar**

Í þessari prófunaraðferð eru notaðar eftirfarandi skilgreiningar:

Íðefni er efni eða blanda.

Undirbúningstímabil er notað til að stöðga örveruefnisþætti setsins og fjarlægja t.d. ammoníak sem er upprunnið í efnisþáttum setsins; þetta á sér stað áður en prófunariðefninu er bætt í setið. Yfirliggjandi vatni er yfirleitt fleygt eftir undirbúning.

EC_x er sá styrkur prófunariðefnisins í seti sem veldur X% (t.d. 50%) áhrifum á líffræðilegar breytur innan tiltekins váhrifatímabils.

Jafnvægstími er notaður til að gera ráð fyrir dreifingu prófunariðefnisins milli fasta fasans, gropuvatnsins og yfirliggjandi vatnsins; hann á sér stað eftir að prófunariðefninu er bætt í setið og áður en prófunarlífverunum er bætt við.

Váhrifafasi er sá tími sem prófunarlífverurnar verða fyrir váhrifum af prófunariðefninu.

Samsett set eða endurgert set, gerviset eða tilbúið set er blanda efna sem er notað til að líkja eftir eðlisrænum efnisþáttum náttúrulegs sets.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC): minnsti styrkur prófunariðefnis þar sem efnið reynist hafa marktæk áhrif (við $p \leq 0,05$) miðað við samanburðinn. Í öllum prófunum, þar sem styrkur er meiri en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif, skal hann á hinn bóginn valda jafnmiklum eða meiri merkjanlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Ef ekki er hægt að uppfylla þessi tvö skilyrði skal skýra til fulls hvernig staðið var að vali á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (og þar með vali á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif).

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) er sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif og hefur engin tölfræðilega marktæk áhrif ($p \leq 0,05$) miðað við samanburðinn innan tilgreinds váhrifatímabils.

Deilistuðull fyrir oktanól og vatn (K_{ow}; stundum einnig gefið upp sem P_{ow}) er hlutfallið milli leysni íðefnis í n-oktanóli og vatni við jafnvægi og sýnir fitusækni íðefnis (kafli A.24 í þessum viðauka). K_{ow} eða logri K_{ow} (log K_{ow}) er notaður sem vísbending um getu íðefnis til að safnast upp í lagarlífverum.

Deilistuðull fyrir lífrænt kolefni og vatn (K_{oc}) er hlutfallið á milli styrks íðefnis í/á lífrænum kolefnishluta í seti og styrks íðefnisins í vatni við jafnvægi.

Yfirliggjandi vatn er vatnið sem liggur yfir setinu í prófunarilátinu.

Gropuvatn eða millivatn er vatnið í rýminu milli sets- eða jarðvegsagna.

Íbætt set er set sem prófunariðefni hefur verið bætt í.

Prófunariðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

2. viðbætur

Samsetning endurgerða vatnsins sem mælt er með

(tekið úr kafla C.1 í þessum viðauka (1. heimild).

a) *Kalsíumklóríðlausn*

Leysið upp 11,76 g af $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ í afjónuðu vatni; fyllið upp að 1 l með afjónuðu vatni

b) *Magnesiumsúlfatlausn*

Leysið upp 4,93 g af $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ í afjónuðu vatni; fyllið upp að 1 l með afjónuðu vatni

c) *Natríumbíkarbónatlausn*

Leysið upp 2,59 g af NaHCO_3 í afjónuðu vatni; fyllið upp að 1 l með afjónuðu vatni

d) *Kalíumklóríðlausn*

Leysið upp 0,23 g af KCl í afjónuðu vatni; fyllið upp að 1 l með afjónuðu vatni

Öll íðefni verða að vera af greiningarhreinleika.

Eðlisleiðni eimaða eða afjónaða vatnsins skal ekki fara yfir $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Blandið 25 ml af hverri af lausnunum í a- til d-lið saman og fyllið með afjónuðu vatni upp að heildarmagninu 1 l. Summa kalsíum- og magnesiumjóna í þessum lausnum er 2,5 mmól á lítra.

Hlutfall kalsíumjóna á móti magnesiumjónum er 4:1 og natríumjóna á móti kalíumjónum 10:1. Sýrurýmud $\text{K}_{\text{S4,3}}$ í þessari lausn er 0,8 mmól á lítra.

Loftið þynningarvatnið þar til súrefnismettun er náð, geymið síðan í u.þ.b. tvo daga án frekari loftunar fyrir notkun.

HEIMILD

- 1) Kafli C.1 í þessum viðauka, Prófun á bráðum eiturrhifum á fisk.

3. viðbætur

Eðlisefnafræðilegir eiginleikar viðunandi þynningarvatns

Efnisbáttur	Styrkur
Efnisagnir	< 20 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	< 2 µg/l
Ójónað ammoníak	< 1 µg/l
Klórleifar	< 10 µg/l
Heildarstyrkur fosfórlífrænna varnarefna	< 50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjöklóruðum bifenyllum	< 50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	< 25 ng/l
Tekið úr OECD (1992) (1. heimild)	

HEIMILD

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

4. viðbætur

Gerviset sem mælt er með — leiðbeiningar um tilreiðslu og geymslu

Innihaldsefni í seti

Innihaldsefni	Eiginleikar	% af þurrvigti sets
Mór	Mosamór, niðurbrotssstig: „í meðallagi“, loftþurrkaður, engar sýnilegar plöntuleifar, finmalaður (kornastærð $\leq 0,5$ mm)	$5 \pm 0,5$
Kvarssandur	Kornastærð: ≤ 2 mm en $> 50\%$ af ögnunum skal vera á bilinu 50–200 μm	75–76
Kaólínitleir	Kaólínítinnihald $\geq 30\%$	20 ± 1
Fóðurgjafi	t.d. brenninetluduft (<i>Folia urticae</i>), lauf af brenninetlu (<i>Urtica dioica</i>), finmöluð (kornastærð $\leq 0,5$ mm); í samræmi við lyfjafraeðistaðla, til manneldis; til viðbótar við þurrt set	0,4–0,5%
Lífrænt kolefni	Stíllt með því að bæta við mó og sandi	$2 \pm 0,5$
Kalsíumkarbónat	CaCO_3 , malað í duft, af efnafræðilegum hreinleika, til viðbótar við þurrt set	0,05–1
Afjónað vatn	Eðlisleiðni $\leq 10 \mu\text{S/cm}$, til viðbótar við þurrt set	30–50

Athugasemd: Ef búist er við hækkuðum styrk ammoníaks, t.d. ef vitað er að prófunariðefnið hamlar nítrun, getur verið gagnlegt að skipta 50% af köfnunarefnisauðugu netludufti út fyrir sellulósa (t.d. alfa-sellulósaduft, af efnafræðilegum hreinleika, kornastærð $\leq 0,5$ mm (1.–2. heimild)).

Tilreiðsla

Mórin er loftþurrkaður og malaður í fingert duft. Sviflausn með tilskildu magni af módufti í afjónuðu vatni er tilreidd með afkastamiklum búnaði til að gera hana einsleita. pH-gildi þessarar sviflausnar er stíllt í $5,5 \pm 0,5$ með CaCO_3 . Sviflausnin er undirbúin í a.m.k. tvo daga og hrært varlega við 20 ± 2 °C til að stöðga sýrustigið og koma á stöðugum örveruefnisþáttum. pH-gildið er mælt aftur og ætti að vera $6,0 \pm 0,5$. Mósviflausnin er síðan blönduð með öðrum innihaldsefnum (sand og kaólínleir) og afjónuðu vatni til að fá einsleitt set með vatnsinnihald á bilinu 30–50% af þurrvigti setsins. pH-gildi endanlegrar blöndu er mælt aftur og stíllt í $6,5$ – $7,5$ með CaCO_3 ef nauðsyn krefur. Ef búist er við ammoníakmyndun getur þó verið gagnlegt að halda pH-gildi setsins undir 7,0 (t.d. á bilinu 6,0–6,5). Tekin eru sýni af setinu til að ákvarða þurrvigti og innihald af lífrænu kolefni. Ef búist er við ammoníakmyndun er hægt að undirbúa samsetta setið í sjö daga við sömu skilyrði og verða síðan ríkjandi í prófuninni (t.d. hlutfall sets og vatns 1:4, hæð setlags eins og í prófunarílatunum) áður en prófunariðefnið er sett í það, þ.e. það skal fyllt upp með vatni sem skal loftað. Við lok undirbúningstímabilsins skal fjarlægja yfirliggjandi vatn og fleygja því. Eftir það er

Íbættur kvarssandur blandaður með seti fyrir hvert meðhöndlunarstig, setinu dreift í ílát samhlíða prófunar og fyllt upp með prófunarvatni. Ílátin eru síðan látin standa við sömu skilyrði og verða síðan ríkjandi í prófuninni sem á eftir fer. Þarna hefst jafnvægstíminn. Lofta skal yfirliggjandi vatn.

Völdum fódurgjafa skal bætt við áður en prófunariðefninu er bætt í setið eða meðan á því stendur. Hægt er að blanda það fyrst með mós víflausn (sjá hér að framan) Þó er hægt að komast hjá óhóflegu niðurbroti fódurgjafans áður en prófunarlífverunum er bætt í — t.d. ef um er að ræða langan jafnvægstíma — með því að hafa tímann milli þess að fódri er bætt við og þangað til váhrif hefjast eins stuttan og unnt er. Til að tryggja að fódrið sé með íbættu prófunariðefni skal blanda fódurgjafanum við setið eigi síðar en þann dag sem prófunariðefninu er bætt í setið.

Geymsla

Geyma má þurr innihaldsefni gervisets á þurrum og svólum stað eða við stofuhita. Nota skal tilreitt set með íbættu prófunariðefni tafarlaust í prófuninni. Sýni af íbættu seti má síðan geyma við þau skilyrði sem mælt er með fyrir viðkomandi prófunariðefni þar til greining fer fram.

HEIMILDIR

- 1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- 2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

5. viðbætur

Ræktunaraðferðir fyrir blóðmaðka

Maðkarnir *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, búa í ferskvatnsseti og eru mikið notaðir í vísitæufnafræðilegum prófunum. Auðvelt er að rækta þá við rannsóknarstofuskilyrði. Yfirlit fyrir ræktunaraðferðir er að finna hér á eftir.

Ræktunaraðferðir

Ræktunarskilyrði fyrir blóðmaðka eru útlustuð ítarlega í Phipps o.fl. (1993) (1. heimild), Brunson o.fl. (1998) (2. heimild), ASTM (2000) (3. heimild), U.S. EPA (2000) (4. heimild). Stutt samantekt á þessum skilyrðum er tilgreind hér á eftir. Helsti kosturinn við *L. variegatus* er hröð æxlun sem leiðir til þess að lífmassi í rannsóknarstofuræktuðum stofnum eykst hratt (t.d. 1. og 3.–5. heimild).

Hægt er að rækta ormana í stórum kerjum (57–80 l) við 23 °C með ljóslotu sem nemur 16 B:8 M (100–1000 lx) og notkun á náttúrulegu vatni sem er endurnýjað daglega (45–50 l á hvert ker). Undirlagið er tilreitt með því að skera óbleiktar, brúnar pappírspurrkur í ræmur sem síðan má bleyta með ræktunaratvni í nokkrar sekúndur til að fá litla búta af pappírundirlagi. Þetta undirlag er síðan hægt að nota strax til að hylja botninn í ræktunarkeri blóðmaðkanna eða frysta það í afjónuðu vatni til síðari nota. Nýtt undirlag í kerinu endist yfirleitt í u.þ.b. tvo mánuði.

Hverri ormarækt er komið á fót með 500–1000 ornum og þeir eru fódraðir á 10 ml sviflausn, sem inniheldur 6 g af upphafsfordri fyrir urriða, þrisvar í viku við endurnýjunar- eða gegnumstreymisskilyrði. Fóðra skal kyrrstöðu- eða hálfkyrrstöðuræktanir sjaldnar til að koma í veg fyrir bakteríu- og sveppavöxt.

Við þessi skilyrði tvöfaldast yfirleitt fjöldi einstaklinga í ræktuninni á u.þ.b. 10–14 dögum.

Að öðrum kosti er hægt að rækta blóðmaðka í kerfi sem samanstendur af kvarssandslagi eins og notað er í gerviset (1–2 cm djúpt) og endurgerðu vatni. Hægt er að nota ílát úr gleri eða ryðfríu stáli, 12–20 cm á hæð, sem ræktunarlát. Lofta skal vatnshlotið varlega (t.d. tvær bólur á sekúndu) með Pasteur-pípettu sem er staðsett u.þ.b. 2 cm ofan við yfirborð setsins. Til að koma í veg fyrir uppsöfnun, t.d. ammoníaks, skal skipta um yfirleggjandi vatn með því að nota gegnumstreymiskerfi, eða handvirkt a.m.k. einu sinni í viku. Hægt er að hafa ánana við stofuhita með ljóslotu sem nemur 16 klst birtu (styrkleikastig 100–1000 lx) og 8 klst myrkri. Í hálfkyrrstöðuræktun (vatnsendurnýjun einu sinni í viku) eru ormarnir fódraðir á TetraMin tvisvar í viku (t.d. 0,6–0,8 mg á hvern cm² af yfirborði setsins) sem hægt er að gefa sem sviflausn með 50 g af TetraMin á hvern ml af afjónuðu vatni.

Hægt er að fjarlægja blóðmaðka úr ræktuninum, t.d. með því að flytja undirlag með finmöskvuðu neti eða lífverur með því að nota eldslétaða glerpípettu með stóru opi (u.þ.b. 5 mm þvermál) yfir í annað bikarglas. Ef undirlag er einnig flutt yfir í þetta bikarglas er bikarglasið sem inniheldur orma og undirlag látið biða yfir nótt við gegnumstreymisskilyrði en það fjarlægir undirlagið úr bikarglasinu en ormarnir verða eftir í botninum á ílátinu. Síðan er hægt að setja þá í nýundirbúin ræktunarkeri eða vinna þá enn frekar fyrir prófunina eins og útlitstað er í (3.–4. heimild) eða hér á eftir.

Tiltekið atriði skiptir verulegu máli þegar *L. variegatus* eru notaðir í prófunum með seti en það er æxlunarmátinn (hlutun (e. *architomy*) eða endurvöxtur, t.d. (6. heimild)). Þessi kynlausa æxlun leiðir til þess að úr verða tveir hlutar sem éta ekkert í tiltekinn tíma þangað til hausinn eða halinn hafa vaxið aftur (t.d. 7.–8. heimild). Þetta merkir að váhrif á *L. variegatus* vegna inntöku á menguðu seti verða ekki samfelld.

Þess vegna ætti að framkvæma samhæfingu til að lágmarka stjórnlausa æxlun og endurmyndun og mikil frávik í prófunarniðurstöðum sem því fylgja. Slík frávik geta orðið þegar einstaklingar, sem hafa skipt sér og éta þar af leiðandi ekkert á tilteknu tímabili, verða fyrir minni váhrifum frá prófunariðefninu en aðrir einstaklingar sem skipta sér ekki meðan á prófuninni stendur (9.–11. heimild). Skipta skal ormunum í tvennt (sanhæfing) 10–14 dögum áður en váhrif hefjast. Velja skal stóra (fullvaxna) orma til samhæfingar sem sýna helst engin merki um nýlegan endurvöxt. Hægt er að setja ormana á sýnisglér í dropa af ræktunaratvni og skera þá sundur um miðjan bolinn með hníf. Þess skal gætt að afturendarnir séu svipaðir á stærð. Afturendarnir eru látnir mynda nýja hausa í ræktunarláti, sem inniheldur sama undirlag og notað er í ræktuninni og endurgert vatn, þangað til váhrif hefjast. Það er visbending um að nýir hausar hafi vaxið aftur þegar samhæfðu ormarnir eru farnir að grafa sig í undirlagið (hægt er að staðfesta að nýir hausar hafi vaxið með því að skoða dæmigert undirsýni í tvíseissmásjá). Reiknað

er með því að prófunarlífverurnar séu í svipuðu lífeðlisfræðilegu ástandi eftir það. Þetta þýðir að þegar æxlun með endurvexti á sér stað hjá samhæfðum ornum meðan á prófuninni stendur er reiknað með því að svo til öll dýrin verði fyrir jafn miklum váhrifunum af íbætta setinu. Fóðra skal samhæfða orma um leið og ormarnir eru farnir að grafa sig í undirlagið eða 7 dögum eftir sundurskurð. Fóðrunarfyrirkomulagið skal vera sambærilegt og hjá venjulegum ræktunum en það getur verið ráðlegt að fóðra samhæfðu ormana á sama fóðurgjafa og á að nota í prófuninni. Ormunum skal haldið við prófunarhitastig, við 20 ± 2 °C. Eftir endurmyndun skal nota óskaddaða, heila orma, sem synda eða skriða fjörlega við vægt líkamlegt áreiti, í prófunina. Koma skal í veg fyrir að ormarnir skaddist eða sjálfsafimi sig, t.d. með því að nota pípettur með eldsléttuðum brúnum eða tannstönglum úr ryðfríu stáli til að meðhöndla þá.

Uppsprettur frumrækta fyrir blóðmaðka (heimilisföng í Bandaríkjunum eru tekin úr (4. heimild))

Evrópa

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
Mommensenstr. 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

Bandaríkin

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

HEIMILDIR

- 1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 269-279.
 - 2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
 - 3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
 - 4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
 - 5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
 - 6) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: 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. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
 - 11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
-

6. viðbætur

Samantekt á niðurstöðum úr hringprófun
 „Prófun á eiturhrifum í seti með blóðmökkum“

Tafla 1

Niðurstöður úr einstökum hringprófunarkeyrslum: Meðaltalsfjöldi orma í samanburði og samanburði með leysi við lok prófunar; SF = staðalfrávik; FS frávíksstuðull

	meðalfjöldi orma í samanburðarlátum	SF	FS (%)	n	meðalfjöldi orma í samanburðum með leysi	SF	FS (%)	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
fjölsetra meðaltal	29,59		20,10		30,61		13,26	
SF	8,32		10,03		7,57		10,48	
n	15				15			
lágmark	16,3				15,0			
hámark	42,0				43,7			
FS (%)	28,1				24,7			

Tafla 2

Niðurstöður úr einstökum hringprófunarkeyrslum: Meðaltalsfjöldi orma í samanburði og samanburði með leysi við lok prófunar; SF = staðalfrávik; FS fráviksstuðull

	heildarþurrvig ormi í hverju íláti samhliða prófunar (samanburður)	SF	FS (%)	n	heildarþurrvig ormi í hverju íláti samhliða prófunar (samanburður með leysi)	SF	FS (%)	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
fjölsetra meðaltal	25,15		20,36		27,68		17,53	
SF	7,87		12,56		7,41		9,10	
n	15				15			
lágmark	12,9				10,5			
hámark	41,3				41,4			
FS (%)	31,3				26,8			

Tafla 3

Eiturhrif pentaklórfenóls: Samantekt á endapunktum í hringprófun; fjölsetra meðaltöl fyrir EC₅₀, styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif og minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif; SF = staðalfrávik; FS fráviksstuðull

líffræðileg breyta		Fjölsetra meðaltal (mg/kg)	lágmark	hámark	Fjölsetra stuðull	SF	FS (%)	rúmfræðilegt meðaltal (mg/kg)
heildarfjöldi orma	EC ₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MGM (%)	22,5	7,1	39,1				
heildarþurrvigting orma	EC ₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MGM (%)	24,8	10,9	44,7				
dánartíðni/lifun	LC ₅₀	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
æxlun (fjölgun orma á hverja samhliða prófun)	EC ₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MGM (%)	29,7	13,9	47,9				
vöxtur (lífmassaaukning á hverja samhliða prófun)	EC ₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MGM (%)	32,2	13,6	65,2				

MGM: minnsti greinanlegi munur í samanburði við samanburðargildi við tilgátuprófun; notað sem mæling á tölfræðilegum styrk

HEIMILD

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 RÁNMIÐILL (HYPOASPIS (GEOLAE LAP S) ACULEIFER) ÆXLUNARPRÓFUN Í JARÐVEGI

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 226 um prófanir (2008). Þessi prófunaraðferð er ætluð til notkunar við að meta áhrif íðefna í jarðvegi á viðkomu jarðvegsmitlategundarinnar *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) og gerir það kleift að meta hömlun á vaxtarhraða tiltekins stofns (1.–2. heimild). Viðkoma merkir í þessu sambandi fjölda ungvíðis í lok prófunartímabilsins. *H. aculeifer* er viðbótarfæðuþrep fyrir þær tegundir sem þegar eru til prófunaraðferðir fyrir. Æxlunarprófun án aðgreiningar og mælingar á mismunandi stigum æxlunarferilsins teljast fullnægjandi að því er varðar þessa prófunaraðferð. Þegar um er að ræða íðefni með annars konar sviðsmynd af váhrifum en í gegnum jarðveginn gæti annars konar nálgun verið viðeigandi (3. heimild).
2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* telst vera viðeigandi fulltrúi fyrir jarðvegslífverur og einkum ránmitla. Hann er að finna um allan heim (5. heimild) og auðvelt er að safna honum og ala á rannsóknarstofu. Yfirlit um líffræði *H. aculeifer* er að finna í 7. viðbæti. Bakgrunnsupplýsingar um vistfræði mitlategunda og notkun þeirra í visteiturefnafræðilegum prófunum er að finna í 4.–12. heimild.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

3. Fullorðin kvendýr eru látin verða fyrir váhrifum af röð styrkleika af prófunaríðefni sem blandað er í jarðveginn. Í upphafi prófunarinnar eru 10 fullorðin kvendýr í hverju íláti samhliða prófana. Karlýr eru ekki notuð í prófuninni því reynsla hefur sýnt að kvendýr maka sig strax eða fljótlega eftir hafa klakist af stigi annars stígs gyðlu (e. *deutonymph stage*) ef karldýr eru til staðar. Auk þess myndi notkun á karldýrum lengja prófunina því þá yrði nauðsynlegt að leggja mikla vinnu í aðgreiningu út frá aldursþrepum. Þörunin sjálf er því ekki hluti af prófuninni. Kvendýrin eru sett í prófunina 28–35 dögum eftir að varptímabilið hefst í samstillingunni (sjá 4. viðbæti) því þá er hægt að líta svo á að kvendýrin hafi þegar parað sig og séu komin yfir forstigi eggvarps. Prófuninni lýkur við 20 °C á 14. degi eftir að kvendýrin voru sett í (dagur 0) sem gerir fyrstu afkvæmunum úr samburðarprófuninni kleift að verða annars stígs gyðlur (sjá 4. viðbæti). Að því er varðar mælda aðalbreytu er fjöldi ungvíðis í hverju prófunaríláti og auk þess fjöldi kvendýra, sem lifa af, ákvarðaður. Viðkoma mítla, sem hafa orðið fyrir váhrifum frá prófunaríðefni, er borin saman við samburðarhópana til að ákvarða EC_x (t.d. EC₁₀, EC₅₀) eða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti), með hliðsjón af tilhögun tilraunar (sjá 29. lið). Yfirlit um prófunaráætlun er að finna í 8. viðbæti.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

4. Æskilegt er að vatnsleysni, log K_{ow}, deilistuðull milli jarðvegs og vatns og gufuþrýstingur fyrir prófunaríðefnið séu þekkt. Viðbótarupplýsingar um afdrif prófunaríðefnisins í jarðveginum, s.s. hraði lífræns og ólífræns niðurbrots, eru æskilegar.
5. Þessa prófunaraðferð má nota fyrir vatnsleysanleg eða óleysanleg íðefni. Hins vegar er aðferðin við ísetningu prófunaríðefnisins mismunandi til samræmis við það. Prófunaraðferðin á ekki við um rokjörm íðefni, þ.e. íðefni þar sem fasti samkvæmt Henry og/edá deilistuðull loftsvatns er hærri en einn, eða íðefni með gufuþrýsting yfir 0,0133 Pa við 25 °C.

GILDI PRÓFUNARINNAR

6. Samburðarprófanir án meðhöndlunar skulu uppfylla eftirfarandi viðmiðanir til að prófunarniðurstaða sé talin gild:
 - Meðaldánartíðni fullvaxinna kvendýra skal ekki fara yfir 20% við lok prófunarinnar.
 - Meðalfjöldi ungvíðis í hverri samhliða prófun (með 10 fullvöxnum kvendýrum) skal vera a.m.k. 50 við lok prófunarinnar.
 - Frávíksstuðull, sem reiknaður er fyrir fjölda mitlaungvíðis í hverri samhliða prófun, skal ekki vera hærri en 30% við lok endanlegu prófunarinnar.

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

7. Ákvarða þarf EC_x og/eða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif fyrir viðmiðunariðefni til að veita fullvissu fyrir því að prófunarskilyrðin á rannsóknarstofunni séu fullnægjandi og til að staðfesta að svörun prófunarlífveranna hafi ekki tekið breytingum með tímanum. Dímetóat (CAS 60-51-5) er viðeigandi viðmiðunariðefni sem sýnt hefur verið fram á að hafi áhrif á stofnstærð (4. heimild). Nota má bórsýru (CAS 10043-35-3) sem annað viðmiðunariðefni. Minni reynslu hefur verið aflað með þessu íðefni. Tveir kostir við tilhögun eru mögulegir:
 - Unnt er að prófa viðmiðunariðefnið samhliða því að eituhrif sérhvers prófunariðefnis eru ákvörðuð við einn styrkleika, sem sýna verður fram á fyrirfram í skammtasvörunarrannsókn að leiði til áhrifa sem orsaka > 50% fækkun afkvæma. Í þessu tilviki skal fjöldi samhliða prófana vera sá sami og í samanburðarprófununum (sjá 29. lið).
 - Að öðrum kosti er viðmiðunariðefnið prófað 1.–2. sinnum á ári í skammtasvörunarprófun. Fjöldi styrkleika og samhliða prófana og bilstuðull eru mismunandi (sjá 29. lið), með hliðsjón af tilhögun sem er valin, en ná skal svörun sem nemur 10–90% áhrifum (bilstuðull 1,8). EC₅₀ fyrir dímetóat, byggt á fjölda ungvíðis, skal vera á bilinu 3,0–7,0 mg af virku efni/kg jarðvegs (þurrvigti). Miðað við niðurstöður sem fengist hafa hingað til með bórsýru ætti EC₅₀, sem byggist á fjölda ungvíðis, að vera á bilinu 100–500 mg/kg jarðvegs (þurrvigti).

LÝSING Á PRÓFUNINNI

Prófunarílát og búnaður

8. Nota skal prófunarílát sem eru 3–5 cm í þvermál (hæð jarðvegs $\geq 1,5$ cm) úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni með þétu loki. Áskrófuð lok eru ákjósanlegust og í því tilviki er hægt að lofta ílátin tvisvar í viku. Einnig má nota lok sem gefa færi á beinum loftskiptum milli undirlagsins og andrúmsloftsins (t.d. grisju). Þar eð halda þarf rakainnihaldi nægilega háu meðan prófunin stendur yfir er nauðsynlegt að fylgjast með þyngd sérhvers prófunarílláts meðan prófunin stendur yfir og bæta við vatni ef þörf krefur. Þetta getur verið sérlega mikilvægt ef ekki eru til áskrófuð lok. Ef notað er ógagnsætt prófunarílát skal lokið vera úr efni sem hleypir birtu inn (t.d. gatað, gegnsætt lok) en kemur jafnframt í veg fyrir að mítlarnir sleppi út. Stærð og tegund prófunarílláts fer eftir aðferð til flæmingar (e. *extraction method*) (sjá nánari upplýsingar í 5. viðbæti). Ef flæming með hita er notuð beint á prófunaríllátið er hægt að bæta neti með viðeigandi möskvastærð við í botninn (lokað þar til flæming fer fram) og jarðvegurinn skal vera nægilega djúpur til að hiti og raki geti farið stigvaxandi.
9. Nota þarf staðlaðan rannsóknarstofubúnað, einkum eftirfarandi:
 - helst glerílát með áskrófuðu loki,
 - þurrskáp,
 - viðsjá,
 - bursta til að færa mítlana til,
 - sýrustigsmæli og ljósmæli,
 - hentugar, nákvæmar vogir,
 - fullnægjandi búnað til hitastýringar,
 - fullnægjandi búnað til loftrastýringar (ekki nauðsynlegt ef váhrifailátunum er lokað með loki),
 - hitastýrðan hitakassa eða lítið herbergi,
 - búnað til flæmingar (sjá 5. viðbæti) (13. heimild)
 - yfirliggjandi ljós með lýsingarstýringu
 - safnkrukkur fyrir mítla sem eru flæmdir burt.

Tilreiðsla á tilbúnum jarðvegi

10. Í þessa prófun er notaður tilbúinn jarðvegur. Tilbúni jarðvegurinn inniheldur eftirfarandi efnisþætti (öll gildi miðast við þurrmassa):

- 5% mosamó, loftþurrkaðan og fínt mulinn (kornastærð 2 ± 1 mm er viðunandi),
- 20% kaólinleir (kaólíninnihald helst yfir 30%),
- u.þ.b. 74% loftþurrkaðan iðnaðarsand (fer eftir því magni kalsíumkarbónats sem þörf er á), aðallega finn sandur með yfir 50% af ögnum á bilinu 50 til 200 míkron. Nákvæmt magn sands fer eftir magni kalsíumkarbónats (sjá að neðan), til samans skal það vera samtals 75%,
- < 1,0% kalsíumkarbónat (CaCO_3 , malað í duft, greiningarhreinleiki) til að ná pH-gildi $6,0 \pm 0,5$; magn kalsíumkarbónats sem bætt er við ræðst e.t.v. fyrst og fremst af gæðum/eðli mósins (sjá 1. athugasemd).

1. *athugasemd*: Magn kalsíumkarbónats sem nauðsynlegt er fer eftir efnisþáttum jarðvegsundirlagsins og skal ákvarðað með því að mæla sýrustig undirsýna úr jarðveginum rétt áður en prófunin er gerð (14. heimild).

2. *athugasemd*: Móinnihaldið í tilbúna jarðveginum vikur frá öðrum prófunaraðferðum á jarðvegslifverum þar sem í flestum tilvikum er notaður 10% mór (t.d. 15. heimild). Samkvæmt Samtökum um plöntuvernd í Evrópu og á Miðjarðarhafssvæðinu (16. heimild) eru þó ekki nema 5% af lifrænu efni í dæmigerðum nytjarðvegi og minnkun á móinnihaldi endurspeglar því minni möguleika náttúrulegs jarðvegs til að ásoga prófunariðefnið á lifrænt kolefni.

3. *athugasemd*: Ef þörf krefur, t.d. vegna tiltekins tilgangs með prófun, getur náttúrulegur jarðvegur frá ómengduðum stöðum einnig gegnt hlutverki prófunar- og/eða ræktunarundirlags. Ef náttúrulegur jarðvegur er notaður skal þó lýsa eiginleikum hans, a.m.k. eftir uppruna (söfnunarstað), sýrustigi, kornastærð (dreifingu kornastærðar) og innihaldi lifræns efnis. Einnig skulu tegund og heiti jarðvegsins samkvæmt jarðvegsflokun koma fram, ef slíkt er tiltækt, og jarðvegurinn skal vera laus við alla mengun. Ef prófunariðefnið er málmur eða lifrænt málm samband skal einnig ákvarða plúsjónaskiptagetu í náttúrulega jarðveginum. Gefa skal sérstakan gaum að því að uppfylla gildisviðmiðanir vegna þess að bakgrunnsupplýsingar um náttúrulegan jarðveg eru iðulega litlar.

11. Þurrinnihaldsefnum jarðvegsins er blandað vel saman (t.d. í stórum rannsóknarstofublandara). Til að ákvarða sýrustig er notuð blanda af jarðvegi og 1 M kalíumklóríðlausn (KCl) eða 0,01 M kalsíumklóríðlausn (CaCl_2) í hlutfallinu 1:5 (sjá 14. heimild og 3. viðbæti). Ef jarðvegurinn er súrari en tilskilið styrkbil (sjá 10. lið) er hægt að stilla hann með því að bæta við viðeigandi magni af kalsíumkarbónati. Ef jarðvegurinn er of basiskur er hægt að stilla hann með því að bæta við meira af blöndunni, sem inniheldur fyrstu þrjú innihaldsefnin sem lýst er í 10. lið, að undanskildu kalsíumkarbónatinu.
12. Hámarksvatnsheldni tilbúna jarðvegsins er ákvörðuð í samræmi við verkferlana sem er lýst í 2. viðbæti. Tveimur til sjö dögum áður en prófunin hefst er þurri, tilbúni jarðvegurinn forrakabættur með því að bæta við hann nægilega miklu af eimuðu eða afjónuðu vatni til að ná u.þ.b. helmingnum af endanlegu vatnsinnihaldi sem er 40–60% af hámarksvatnsheldni. Rakainnihald er stillt í 40–60% af hámarksvatnsheldni með því að bæta prófunariðefnislausninni við og/eða með því að bæta við eimuðu eða afjónuðu vatni (sjá 16–18. lið). Gera skal einfalda viðbótarathugun á rakainnihaldi jarðvegs með því að kreista jarðveginn varlega í höndinni; ef rakainnihaldið er rétt ættu litlir vatnsdropar að koma í ljós milli fingranna.
13. Rakainnihald jarðvegsins er ákvarðað við upphafi og lok prófunar með þurrkun í stöðuga þyngd við 105°C í samræmi við ISO 11465 (17. heimild) og sýrustig jarðvegs í samræmi við 3. viðbæti eða ISO 10390 (14. heimild). Gera skal þessar mælingar á viðbótarsýnum án mitla, bæði úr samanburðarjarðvegi og jarðvegi með hverjum prófunarstyrk. Ekki skal stilla sýrustig jarðvegs þegar súr eða basisk iðefni eru prófuð. Fylgjast skal með rakainnihaldinu í allri prófuninni með því að vigta ílátin með reglubundnu millibili (sjá 20. og 24. lið).

Val og undirbúningur á tilraunadýrum

14. Tegundin sem notuð er í prófuninni er *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Til að hefja prófunina þarf að nota fullvaxna kvenmítla sem fengin eru úr samstilltum aldurshópum. Setja skal mítlana í u.þ.b. 7–14 dögum eftir að þeir eru fullvaxnir, 28–35 dögum eftir að eggvarp í samstillingu hefst (sjá 3. lið og 4. viðbæti). Skrá skal uppruna mítlanna eða birginn og viðhald á rannsóknarstofuræktun. Ef rannsóknarstofuræktun er haldið er mælt með því að tegundin sé sanngreind a.m.k. einu sinni á ári. Sanngreiningarblað fylgir sem 6. viðbætur.

Tilreiðsla prófunarstyrks

15. Prófunariðefninu er blandað í jarðveginn. Lífrænir leysar, sem eru notaðir sem hjálparefni við meðhöndlun jarðvegs með prófunariðefni, skulu valdir á grundvelli lítilla eiturrhifa þeirra á mítla og hafa þarf viðeigandi samanburðarhóp með leysi í prófunartilhöguninni (sjá 29. lið).

Prófunariðefni sem er leysanlegt í vatni

16. Lausn prófunariðefnisins er tilreidd í afjönuðu vatni í magni sem nægir fyrir allar samhliða prófanir með einum prófunarstyrk. Mælt er með því að nota viðeigandi magn af vatni til að fá það rakainnihald sem þörf er á, þ.e. 40 til 60% af hámarksvatnsheldni (sjá 12. lið). Hverri lausn prófunariðefnisins er blandað vandlega við einn samant af forrakabættum jarðvegi áður en hann er settur í prófunarilátið.

Prófunariðefni sem er óleysanlegt í vatni

17. Að því er varðar íðefni sem eru óleysanleg í vatni en leysanleg í lífrænum leysum er hægt að leysa prófunariðefnið upp í minnsta mögulega magni af hentugu burðarefni (t.d. asetoni). Einungis skal nota rokgyarna leysa. Þegar slík burðarefni eru notuð skulu allir prófunarstyrkleikar og samanburðarsýni innihalda sama lágmarksmagn burðarefnisins. Burðarefninu er úað á eða blandað við lítið magn, t.d. 10 g, af finum kvarssandi. Leiðréttu skal heildarsandinnihald undirlagsins fyrir þetta magn. Burðarefnið er fjarlægð með uppgufun í súgskáp í a.m.k. eina klst. Þessari blöndu af kvarssandi og prófunariðefni er bætt í forrakabættan jarðveg og blandað vandlega saman með því að bæta við viðeigandi magni af afjönuðu vatni til að fá það rakainnihald sem þörf er á. Lokablandan er sett í prófunarilátin. Athuga þarf að sumir leysar geta verið eitruðir fyrir mítla. Því er mælt með því að nota viðbótarsamanburðarprófun með vatni án burðarefnis ef eiturrhif leysisins gagnvart mítlunum eru ekki þekkt. Ef sýnt er fram á það með fullnægjandi hætti að leysirinn (í þeim styrk sem á að nota) hafi engin áhrif er hægt að sleppa samanburðarprófun með vatni.

Prófunariðefni sem er torleysanlegt í vatni og lífrænum leysum

18. Að því er varðar íðefni sem eru torleysanleg í vatni og lífrænum leysum er jafngildi 2,5 g af finmöluðum kvarssandi á hvert prófunarilát (t.d. 10 g af finum kvarssandi fyrir fjórar samhliða prófanir) blandað með magninu af prófunariðefninu til að fá tilætlaðan prófunarstyrk. Leiðréttu skal heildarsandinnihald undirlagsins fyrir þetta magn. Þessari blöndu af kvarssandi og prófunariðefni er bætt í forrakabættan jarðveg og blandað vandlega saman eftir að viðeigandi magni af afjönuðu vatni er bætt við til að fá það rakainnihald sem þörf er á. Lokablöndunni er skipt á milli prófunarilátanna. Aðferðin er endurtekin fyrir hvern prófunarstyrk og viðeigandi samanburður er einnig tilreiddur.

VERKFERLI**Prófunar- og samanburðarhópar**

19. Mælt er með tíu fullvöxnum kvendýrum í 20 g þurrmassa af tilbúnum jarðvegi fyrir hvert samanburðar- og meðhöndlunarilát. Bæta skal prófunarlífverum við innan tveggja klukkustunda frá tilreiðslu endanlegs prófunarundirlags (þ.e. eftir að prófunarefnið hefur verið sett í). Í sérstökum tilvikum (t.d. þegar öldrun er talin vera ákvörðunarþáttur) er hægt að lengja tímann milli tilreiðslu á endanlega prófunarundirlaginu og að mítlum sé bætt við (sjá nánari upplýsingar um slíka öldrun í 18. heimild). Í slíkum tilvikum verður þó að leggja fram vísindaleg rök.

20. Eftir að mítlarnir hafa verið settir í jarðveginn er þeim gefið fóður og upphafsþyngd sérhvers prófunariláts skal mæld og notuð sem viðmiðun til að fylgjast með rakainnihaldi jarðvegsins í allri prófuninni eins og lýst er í 24. lið. Síðan er prófunarilátunum lokað eins og lýst er í 8. lið og þeim komið fyrir í prófunarklefa.
21. Viðeigandi samanburður er tilreiddur fyrir hverja aðferð við ísetningu prófunariðefnis sem lýst er í 15. til 18. lið. Viðeigandi aðferðum, sem er lýst, er fylgt við tilreiðslu samanburðarhópana að því undanskildu að prófunariðefninu er ekki bætt í. Þannig er lífrænum leysum, kvarssandi eða öðrum burðarefnum, eftir því sem við á, bætt í samanburðarhópana í styrk/magni sem er í meðhöndlunarhópunum. Ef leysir eða annað burðarefni er notað til að setja prófunariðefnið í skal einnig tilreiða og prófa viðbótarsamanburðarprófun án burðarefnisins eða prófunariðefnisins ef eiturrhif leysisins eru ekki þekkt (sjá 17. lið).

Prófunarskilyrði

22. Prófunarhitastigið skal vera 20 ± 2 °C. Hitastig skal skráð a.m.k. daglega og aðlagð, ef nauðsyn krefur. Prófunin er framkvæmd við stýrða birtu- og myrkvunarhringrás (helst 16 klst. birta og 8 klst. myrkur) og lýsingu sem nemur 400 til 800 lúxum nálægt prófunarilátunum. Vegna samanburðarhæfis eru þessi skilyrði þau sömu og í öðrum visteiturfnafræðilegum jarðvegsprófunum (t.d. 15. heimild).
23. Tryggja skal loftskipti með því að lofta prófunarilátin a.m.k. tvisvar í viku ef áskráfuð lok eru notuð. Ef grísjulok er notað skal gefa því sérstakan gaum að viðhalda rakamagni jarðvegsins (sjá 8. og 24. lið)
24. Vatnsinnihaldi jarðvegsundirlagsins í prófunarilátunum er viðhaldið í allri prófuninni með því að vigta prófunarilátin og, ef þörf krefur, bæta vatni í þau aftur með reglubundnu millibili (t.d. einu sinni í viku). Tap er bætt upp, eftir því sem nauðsyn krefur, með afjönuðu vatni. Rakainnihald meðan prófunin stendur yfir skal ekki víkja meira en 10% frá upphaflegu gildi.

Fóðrun

25. Sýnt hefur verið fram á að ostamítlar (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) eru heppilegur fóðurgjafi. Lítil stökkmor (t.d. ungvíði *Folsomia candida* Willem, 1902 eða *Onychiurus fimatus* (19.–20. heimild), pottormar (t.d. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) eða þráðormar (t.d. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) geta einnig hentað (21. heimild). Mælt er með því að athuga fóðrið áður en það er notað í prófun. Tegund og magn fóðurs skulu tryggja nægilegan fjölda ungvíðis til að uppfylla gildisviðmiðanir (6. liður). Við val á bráð skal hafa verkunarhátt prófunarefnisins í huga (t.d. getur mítlasæfir einnig verið eittraður fyrir fæðumítlana (e. *food mite*), sjá 26. lið).
26. Fóður skal látið í té að vild (þ.e. lítill skammtur í hvert skipti (á spaðaoddi)). Í þessu skyni er einnig hægt að nota útsogsbúnað (e. *exhaustor*) með litlum sogkrafti, eins og lagt er til í stökkmorsprófuninni, eða fíngerðan málningarpensil. Alla jafna er nóg að gefa fóður í upphafi prófunarinnar og tvisvar til þrisvar í viku. Ef prófunarefni virðist vera eittrað fyrir bráðina skal taka til athugunar að auka fóðrunarhraða og/eða finna annan fóðurgjafa.

Val á prófunarstyrkleikum

27. Fyrirliggjandi þekking á eiturrhifum prófunariðefnis ætti að koma að gagni við val á hæfilegum prófunarstyrkleika, t.d. úr skammtastærðarannsóknunum. Skammtastærðarprófun er gerð, ef nauðsyn krefur, með fimm styrkleikum af prófunariðefninu á bilinu 0,1–1000 mg/kg af þurrum jarðvegi með a.m.k. eina samhlíða prófun fyrir meðhöndlunar- og samanburðarilát. Tímalengd skammtastærðarprófunar er 14 dagar en eftir það er dánartíðni fullvaxinna mítla og fjöldi ungvíðis ákvarðaður. Æskilegt er að velja styrkleikabil í endanlegu prófuninni þannig að það nái yfir styrkleika sem hafa áhrif á fjölda ungvíðis en hafa ekki áhrif á lífun móðurkynslóðarinnar. Hins vegar er þetta e.t.v. ekki mögulegt að því er varðar íðefni sem hafa banvæn eða nær banvæn áhrif við næstum því sama styrkleika. Þeir styrkleikar sem eru notaðir í prófuninni skulu ná yfir hrifstyrkina (t.d. EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀) og styrksviðið sem verið er að kanna m.t.t. áhrifa prófunariðefnisins. Einungis í undantekningartilvikum skal framreikna langt undir lágsta styrk, sem hefur áhrif á prófunarlífverunna, eða yfir hæsta styrk sem er prófaður og það skal skýra til fulls í skýrslunni.

Tilhögun tilraunar*Skammtasvörunarprófanir*

28. Þrenns konar tilhögun prófana er lögð til á grundvelli ráðlegginga sem leiða af annarri hringprófun (æxlunarprófun á pottormum (Enchytraeid)) (22. heimild). Almennur hentugleiki þessarar tilhögunar var staðfestur með niðurstöðu á fullgildingu á *H. aculeifer*.
29. Við ákvörðun á styrksviði skal hafa eftirfarandi í huga:
 - Til að ákvarða EC_x (t.d. EC_{10} , EC_{50}) skal prófa tólf styrkleika. Mælt er með a.m.k. tveimur samhliða prófunum fyrir hvern prófunarstyrk og sex samhliða samanburðarprófunum. Bilstuðullinn getur verið breytilegur, þ.e. minni en eða jafn og 1,8 á því bili sem búist er við að áhrif komi fram og yfir 1,8 við minni og minni styrk.
 - Til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif skal prófa a.m.k. fimm styrkleika í jafnhlutfallaröð. Mælt er með fjórum samhliða prófunum fyrir hvern prófunarstyrk ásamt átta samanburðarprófunum. Munurinn á styrkleikum skal nema stuðli sem fer ekki yfir 2,0.
 - Samsett aðferð gerir það kleift að ákvarða bæði styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif og EC_x . Nota skal átta meðhöndlunarstyrkleika í jafnhlutfallaröð. Mælt er með fjórum samhliða prófunum fyrir hvern meðhöndlunarhóp ásamt átta samanburðarhópum. Munurinn á styrkleikum skal nema stuðli sem fer ekki yfir 1,8.

Markprófun

30. Ef engin áhrif eru merkjanleg við hæsta styrk í skammtastærðarprófun (þ.e. 1000 mg/kg jarðvegs (þurrvigt)) er hægt að framkvæma endanlega æxlunarprófun sem markprófun og nota prófunarstyrkinn 1000 mg/kg jarðvegs (þurrvigt). Markprófun gefur færi á að sýna fram á að styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif eða EC_{10} á æxlun er hærri en styrkleikamörkin en lágmarkar um leið fjölda mítla sem er notaður í prófuninni. Nota skal átta samhliða prófanir, bæði fyrir meðhöndlaða jarðveginn og samanburðinn.

Lengd prófunar og mælingar

31. Skrá skal allan mismun sem kemur í ljós milli atferlis og forms og byggingar mítla í samanburðar- og meðhöndlunarílátum.
32. Á 14. degi eru þeir mítlar sem eru lifandi flæmdir úr jarðveginum með hita-/ljósflæmingu eða með annarri viðeigandi aðferð (sjá 5. viðbæti). Fjöldi ungvíðis (þ.e. lirlur, fyrsta stigs gyðlur og annars stigs gyðlur) og fullvaxinna dýra er talinn sitt í hvoru lagi. Skrá skal alla fullvaxna mítla, sem ekki finnast á þessum tímamarki, sem dauða og gera ráð fyrir að þeir mítlar hafi drepist og rotnað áður en matið er framkvæmt. Skilvirkni flæmingar skal fullgilt einu sinni eða tvisvar á ári í samanburðarprófun með þekktum fjölda fullvaxinna dýra og ungvíðis. Skilvirkni skal vera yfir 90% að meðaltali samanlagt fyrir öll þroskastig samantekin (sjá 5. viðbæti). Talning á fullvöxnum dýrum og ungvíði er ekki stillt af m.t.t. skilvirkni.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**Úrvinnsla niðurstaðna**

33. Upplýsingar um tölfræðiaðferðir sem hægt er að nota við greiningu á niðurstöðum úr prófunum eru gefnar í 36.–41. lið. Að auki skal leita fanga á skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 54 um gildandi nálganir við tölfræðilega greiningu gagna um visteiturhrif: Leiðbeiningar fyrir notkun (e. *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*) (31. heimild).
34. Helsti endapunktur prófunarinnar er viðkoma, í þessu tilviki fjöldi ungvíðis sem verður til í sérhverju samhliða prófunarílati (með 10 fullvöxnum kvendýrum). Í tölfræðilegri greiningu þarf meðaltal (X) og dreifni (s^2) fyrir hvern meðhöndlunarhóp og hvern samanburðarhóp til að reikna út viðkomu. Meðaltal (X) og dreifni (s^2) eru notuð við dreifnigreiningaraðferðir s.s. t-próf, Dunnetts-prófun eða Williams-prófun sem og til að reikna 95% öryggisbil.

Athugasemd: Þessi helsti endapunktur jafngildir frjósemi sem er mæld sem fjöldi lifandi ungvíðis sem verður til meðan prófunin stendur yfir, deilt með fjölda kvendýra af foreldrakynslóð sem er settur í við upphaf prófunarinnar.

35. Fjöldi fullvaxinna kvendýra sem lifir af í ómeðhöndluðum samanburðarhópum er mikilvæg gildisviðmiðunarforsenda og skal skjalfestur. Eins og í skammtastærðarrannsókninni skal einnig skrá öll skaðleg einkenni í lokaskýrslunni.

EC_x

36. EC_x-gildi, þ.m.t. tilheyrandi neðri og efri 95% öryggismörk fyrir breytuna sem lýst er í 34. lið, eru reiknuð út með viðeigandi tölfræðiaðferðum (t.d. probit-greiningu, umhverfðri jöfnu eða Weibull-jöfnu, klipptri Spearman-Kärber-aðferð eða einföldum innreikningi). EC_x fæst með því að setja gildi, sem samsvarar x% af meðaltali samanburðarins, inn í jöfnuna sem fæst. Til að reikna út EC₅₀ eða annan EC_x skulu meðalgildi hverrar meðhöndlunar (X) sett í aðhvarfsgreiningu.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif

37. Ef tölfræðilegri greiningu er ætlað að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif er nauðsynlegt að nota tölfræðilegar upplýsingar um hvert ílát (lítið er á hvert stöku ílátanna sem samhliða prófun). Nota skal viðeigandi tölfræðiaðferðir (samkvæmt skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 54 um gildandi nálganir við tölfræðilega greiningu gagna um visteiturhrif: Leiðbeiningar fyrir notkun (e. *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*)). Skaðleg áhrif prófunarefnisins samanborið við samanburðarprófunina eru yfirleitt rannsökuð með því að nota einhliða (minni) tilgátuprófun við $p \leq 0,05$. Dæmi eru gefin í eftirfarandi liðum.
38. Hægt er að prófa normaldreifingu gagna, t.d. með Kolmogorov-Smirnov-prófun á mátgæðum, prófun til að ákvarða hlutfall milli styrkbils og staðalfráviks (e. *Range-to-standard-deviation ratio test (R/s-test)*) eða Shapiro-Wilk-prófun (tvíhliða, $p \leq 0,05$). Hægt er að nota Cochran-prófun, Levene-prófun eða Bartlett-prófun (tvíhliða, $p \leq 0,05$) til að prófa einsleitni dreifni. Ef forsendur stikabundinna prófunaraðferða (normleiki, einsleitni dreifni) eru uppfylltar er hægt að framkvæma einhliða dreifnigreiningu (ANOVA) og síðan margfaldar samanburðarprófanir. Hægt er að nota margþættan samanburð (t.d. t-próf Dunnetts) eða leitni-prófun með stiglækkun (t.d. Williams-prófun ef um er að ræða einhalla tengsl milli skammts og svörunar) til að reikna út hvort það er marktækur munur ($p \leq 0,05$) á milli samanburðar og hinna ýmsu styrkleika prófunarefnisins (val á tillagðri prófun samkvæmt skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 54 um gildandi nálganir við tölfræðilega greiningu gagna um visteiturhrif: Leiðbeiningar fyrir notkun (e. *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*)). Að öðrum kosti skal nota stikalaugar aðferðir (t.d. Bonferroni-U-próf samkvæmt Holm eða Jonckheere-Terpstra-leitni-prófun) til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif og minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif.

Markprófun

39. Ef markprófun (samanburður á einungis einu samanburðarlíati og meðhöndlunarlíati) hefur verið framkvæmd og forsendur stikabundinna prófunaraðferða (normleiki, einsleitni) eru uppfylltar er hægt að meta mælanlegar svaranir með t-prófi. Nota má t-prófun fyrir ójafna dreifni (Welch) eða stikalaus prófun, s.s. Mann-Whitney-U-prófun, ef þessar kröfur eru ekki uppfylltar.
40. Til að ákvarða umtalsverðan mun milli samanburðarláta (samanburður og samanburður með leysi) er hægt að prófa samhliða prófanir fyrir hverja samanburðarprófun eins og lýst er fyrir markprófunina. Ef ekki greinist umtalsverður munur í þessum prófunum er hægt að hópa allar samanburðarprófanir og samhliða samanburðarprófanir með leysi. Að öðrum kosti skal bera öll meðhöndlunarílat saman við samanburðinn sem er með leysi.

Prófunarskýrsla

41. Í prófunarskýrslunni skulu a.m.k. vera eftirtaldar upplýsingar:

— Prófunariðefni

- auðkenni prófunariðefnisins, heiti, lotu- og CAS-númer, hreinleiki,
- eðlisefnafræðilegir eiginleikar prófunariðefnisins (t.d. log K_{ow}, vatnsleysni, gufuþrýstingur, fasti samkvæmt Henry (H) og helst upplýsingar um afdrif prófunariðefnisins í jarðvegi).

— Prófunarlífverur

- auðkenning og birgir prófunarlífveranna, lýsing á ræktunarskilyrðum,
- aldursbil prófunarlífvera.

- *Prófunarskilyrði*
 - lýsing á tilhögun tilraunar og verkferli,
 - upplýsingar um tilreiðslu prófunarjarðvegs; ítarleg lýsing ef náttúrulegur jarðvegur er notaður (uppruni, saga, dreifing kornastærðar, sýrustig, innihald lífræns efnis og flokkun jarðvegs ef hún er tiltæk)
 - hámarksvatnsheldni jarðvegsins,
 - lýsing á aðferðinni sem notuð var til að koma prófunariðefninu í jarðveginn,
 - upplýsingar um hjálparefni sem eru notuð til að gefa prófunariðefnið,
 - stærð prófunaríláta og þurrmassi prófunarjarðvegs í hverju íláti,
 - prófunarskilyrði: ljósstyrkur, lengd birtu- og myrkvunarhringrásar, hitastig,
 - lýsing á fæðunarfyrikomulaginu, tegund og magn fæðurs sem notað er í prófuninni, fæðunardagar,
 - sýrustig og vatnsinnihald jarðvegsins við upphaf prófunar og meðan hún stendur yfir (samanburðarprófun og sérhver meðhöndlunarprófun)
 - nákvæm lýsing á aðferð til flæmingar og skilvirkni flæmingar.
- *Niðurstaða prófunar*
 - fjöldi ungvíðis sem er ákvarðaður í hverju prófunaríláti við lok prófunar,
 - fjöldi fullvaxinna kvendýra og dánartíðni fullvaxinna dýra (%) í hverju prófunaríláti við lok prófunar
 - lýsing á augljósum einkennum eða greinilegum breytingum á atferli,
 - niðurstöður sem fást með viðmiðunarprófunariðefninu,
 - samanteknar tölfræðilegar upplýsingar (EC_x og/eða styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif) þ.m.t. 95% öryggismörk og lýsing á reikniaðferð,
 - ferill fyrir samband styrks og svörunar,
 - frávik frá þeim verkferlum sem lýst er í þessari prófunaraðferð og öll óvenjuleg tilvik meðan prófunin stendur yfir.

HEIMILDIR

- 1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- 2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259-274.
- 3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *JSS — Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- 4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.
- 5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492
- 6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: p 241-249.
- 7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.
- 8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

- 9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.
- 10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.
- 11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.
- 12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.
- 13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.
- 14) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
- 15) Kaffli C.8 í þessum viðauka. Eiturhrif á ánamaðka.
- 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., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- 19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola). Ges.allg. angew. Ent. 3:122-125.
- 20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.
- 21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.
- 22) Kaffli C.32 í þessum viðauka. Æxlunarprófun á pottormum.
- 23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.
- 24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.
- 25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.
- 26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with “good genes” in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.
- 27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- 28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

- 29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). *Zoologica Poloniae* 24, 11-59.
 - 30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). *Acarologia* 6, 647-658.
 - 31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18
-

*I. viðbætur***Skilgreiningar**

Eftirfarandi skilgreiningar gilda fyrir þessa prófunaraðferð (í þessari prófun er allur hrifstyrkur gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs):

Íðefni er efni eða blanda

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif er styrkur prófunariðefnis þar sem engin áhrif eru merkjanleg. Í þessari prófun hefur styrkur, sem svarar til styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif, engin tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif er minnsti styrkur prófunariðefnis sem hefur tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun.

EC_x (hrifstyrkur sem hefur x% áhrif) er sá styrkur sem hefur x% áhrif á prófunarlífverur innan tiltekens váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun. Til dæmis er EC₅₀ sá styrkur sem metið er að hafi, við prófunarendapunkt, áhrif á 50% af þýði sem er látið verða fyrir váhrifum yfir tilgreint váhrifatímabil.

Prófunariðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófað með þessari prófunaraðferð.

2. viðbætur

Ákvörðun á hámarksvatnsheldni jarðvegsins

Eftirfarandi aðferð til að ákvarða hámarksvatnsheldni jarðvegsins er talin heppileg. Henni er lýst í viðauka C við ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction (23. heimild)).

Tilgreindu magni (t.d. 5 g) af prófunarjarðvegsundirlagi er safnað með hentugu sýnatökuáhalði (kjarnabor o.s.frv.). Síupappír er settur fyrir botninn á rörinu, síðan er það fyllt af vatni og sett á stand í vatnsbaði. Rörið skal smám saman fært í kaf þar til vatnshæðin er ofan við hæð jarðvegsins. Það skal síðan skilið eftir í vatninu í u.þ.b. þrjár klst. Þar eð vatnið sem hárpípur í jarðveginum draga í sig situr ekki allt eftir skal láta hripa úr jarðvegssýninu í tvær klst. með því að setja rörið á beð með mjög blautum, finmuldum kvarssandi í lokuðu ílátí (til að koma í veg fyrir þornun). Síðan skal þurrka sýnið þar til það hefur náð stöðugum massa við 105 °C og vege það. Þá er hægt að reikna út vatnsheldni eftir því sem hér segir:

$$\text{Vatnsheldni (í \% af þurrmassa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Þar sem:

S = vatnsmettað undirlag + massi rörs + massi síupappírs

T = tara (massi rörs + massi síupappírs)

D = þurrmassi undirlags

*3. viðbætur***Ákvörðun á sýrustigi jarðvegs**

Eftirfarandi aðferð við að ákvarða sýrustig jarðvegs byggist á lýsingu í ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (16. heimild).

Tilgreint magn af jarðvegi er þurrkað við stofuhita í a.m.k. 12 klst. Síðan er tilreidd sviflausn með jarðveginum (inniheldur a.m.k. 5 g af jarðvegi) sem nemur fimmföldu rúmmáli af annað hvort 1 M lausn af kalíumklóríði af greiningarhreinleika eða 0,01 M lausn af kalsíumklóríði af greiningarhreinleika (CaCl_2). Sviflausnin er síðan hrist rækilega í fimm mínútur og síðan látin setjast í a.m.k. 2 klst. en ekki lengur en í 24 klst. Síðan er sýrustig fljótandi fasans mælt með sýrustigsmæli sem hefur verið kvarðaður fyrir hverja mælingu með viðeigandi röð jafnalausna (t.d. pH-gildi 4,0 og 7,0).

4. viðbætur

Eldi *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, fæðumítlar og samstilling ræktunar**Eldi *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:**

Hægt er að viðhalda ræktunum í plastílátum eða glerkrukum sem eru fylltar með blöndu af gífsi/viðarkoladufti (9:1). Hægt er að halda gípsefninu röku með því að bæta við nokkrum dropum af eimuðu eða afjónuðu vatni, ef þörf krefur. Ákjósanlegasta eldshitastigið er 20 ± 2 °C, birtu-/myrkurfyrirkomulag skiptir ekki máli fyrir þessa tegund. Nota má mítla af tegundunum *Tyrophagus putrescentiae* eða *Caloglyphus* sp. sem brád (fæðumítla skal meðhöndla með varúð þar eð þeir geta valdið ofnæmi hjá mönnum) en þráðormar, pottormar og stökkmor henta einnig sem föður. Uppruni þeirra skal skráður. Stofninn getur hafist með einu kvendýri vegna þess að karldýr þroskast í ófrjógvuduð eggjum. Kynslóðir skarast að miklu leyti. Kvendýr getur lifað í a.m.k. 100 daga og losað u.þ.b. 100 egg á líftíma sínum. Það losar flest egg á aldrinum 10 til 40 daga (eftir að það er fullvaxið), þ.e. sem nemur $2,2$ eggjum á hvert kvendýr⁻¹ dag⁻¹. Þroskunartími frá eggi til fullvaxins kvendýrs er u.þ.b. 20 dagar við 20 °C. Halda skal fleiri en einni ræktun áður en prófunin hefst.

Eldi *Tyrophagus putrescentiae*:

Mítlarnir eru hafðir í gleríláti sem fyllt er með fíngerðu ölgersdufti sem sett er í plastfötu sem er fyllt með KNO₃-lausn til að koma í veg fyrir að þeir sleppi út. Fæðumítlarnir eru settir ofan á duftið. Þar á eftir er þeim blandað varlega saman við duftið (það þarf að skipta því út tvisvar í viku) með spaða.

Samstilling ræktunar:

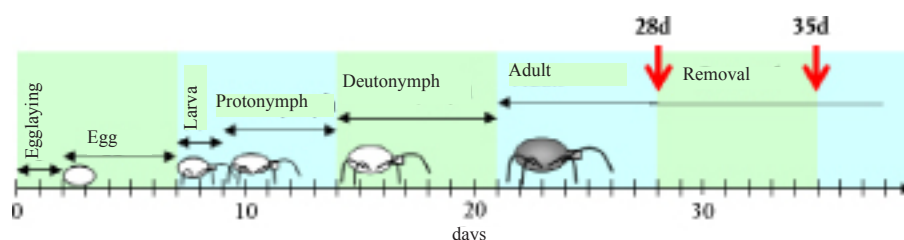
Lífverurnar, sem notaðar eru í prófuninni, skulu vera á svipuðum aldri (u.þ.b. 7 dögum eftir að þær eru orðnar fullvaxnar). Við 20 °C eldshitastig er þessu náð með því að

flytja kvendýr yfir í hreint eldisilát og bæta við nægu föðri

- gera ráð fyrir tveimur til þremur dögum til egglosunar og fjarlægja kvendýr,
- taka fullvaxin kvendýr til prófunar á bilinu 28.–35. dögum eftir upphaf eldis og setja þau í hrein eldisilát.

Auðvelt er að greina fullvaxin kvendýr frá karldýrum og dýrum á öðrum þroskastigum vegna þess að þau eru stærri, þrútin að lögun og með brúnan bakskjöld (karldýr eru grennri og flöt), óþroskuð dýr eru hvít yfir í rjómalituð. Þroskun mítla fylgir að mestu mynstrinu sem lýst er hér að neðan við 20 °C (mynd): Egg 5 dagar, lírfá 2 dagar, fyrsta stigs gyðla 5 dagar, annars stigs gyðla 7 dagar, forstígmabil eggvarps hjá kvendýri 2 dagar. Eftir það eru mítlarnir fullvaxnir.

Mynd

Þroskun *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* við 20 °C. (fjarlæging = kvendýr sem notuð eru í prófuninni)

Fullvaxin tilraunadýr eru fjarlægð úr samstilltri ræktun og sett í prófunarilátin á bilinu 28.–35. dögum eftir að kvendýr af foreldrakynslóð hefja eggvarp (þ.e. 7–14 dögum eftir að þau urðu fullvaxin). Þetta tryggir að tilraunadýrin séu þegar komin fram yfir forstígstímabil eggvarps og hafi makast við karldýr sem eru einnig í ræktunarilátinu. Athuganir á ræktunum á rannsóknarstofum benda til þess að kvendýrin þarist strax eða stuttu eftir að þau verða fullvaxin ef karldýr eru til staðar (Ruf, Vaninnen, eigin athuganir). Sjö daga tímabilið er valið til að auðvelda aðlögun við rannsóknarstofuvenjur og draga úr einstaklingsbundum breytileika í þroska mítlanna. Eggvarp skal hafið með a.m.k. sama fjölda kvendýra og þörf verður á fyrir prófunina (ef t.d. er þörf er á 400 kvendýrum í prófunina á að láta a.m.k. 400 kvendýr losa egg í tvo til þrjú daga). Að minnsta kosti 1200 egg skulu vera upphafspunktur fyrir samstilltan stofn (kynjahlutfall u.þ.b. 0,5, dánartíðni u.þ.b. 0,2). Til að koma í veg fyrir sjálfsafrán er vænlegra að hafa ekki fleiri en 20–30 verpandi kvendýr í einu iláti.

5. viðbætur

Aðferðir til flæmingar

Að því er varðar örliðdýr er flæming með hita heppileg aðferð til að aðskilja dýr frá jarðvegi/undirlagi (sjá mynd hér að neðan). Þessi aðferð er byggð á virkni lífveranna sem þýðir að einungis dýr sem hreyfa sig verða skráð. Meginreglan í flæmingu með hita er að gera aðstæðurnar fyrir lífverurnar í sýninu þannig að þær fari smám saman versnandi svo lífverurnar fari úr undirlaginu og falli í festingarvökva (t.d. etanól). Mikilvægir punktar eru tímalengd flæmingarinnar og stíglækkun frá góðum aðstæðum yfir í þökkalegar yfir í slæmar aðstæður fyrir lífverurnar. Tímalengd flæmingar í eiturhrifaþrófunum verður að vera eins stutt og unnt er vegna þess að allur stofnvöxtur meðan flæmingin stendur yfir myndi skekkja niðurstöðurnar. Hins vegar verða hita- og rakaaðstæður í sýninu ávallt að vera á því bili sem gerir mítlunum kleift að hreyfa sig. Hitun jarðvegssýnis veldur því að undirlagið þornar. Ef þurrkunin gerist of snögglega gætu einhverjir mítlar einnig þornað áður en þeir ná að komast út.

Þess vegna er lagt til að eftirfarandi verkferli sé fylgt (24.–25. heimild):

Búnaður: Tullgren-trekt eða sambærilegar aðferðir t.d. McFadyen (hitun ofan frá, sýni sett yfir trekt)

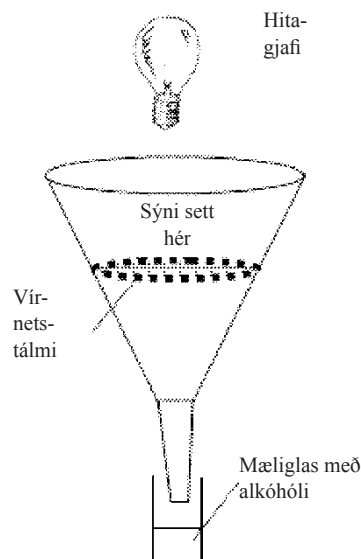
Hitunarfyrirkomulag: 25 °C í 12 klst., 35 °C í 12 klst., 45 °C í 24 klst. (alls í 48 klst.). Hitastig í undirlaginu skal mælt.

Festingarvökvi: 70% etanól

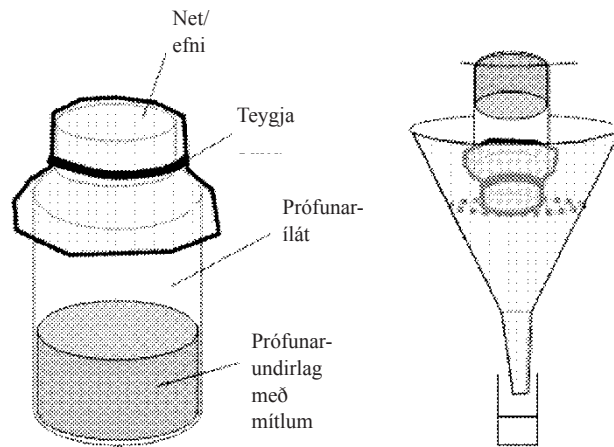
Nánari upplýsingar: Glermælingaglasíð, sem var notað í prófuninni, er tekið. Lokið tekið af og net- eða efnisbút vafið um opið. Möskvastærð efnisins skal vera 1,0 til 1,5 mm. Efnið er fest með teygju. Mælingaglasinu er hvolfst varlega og sett í flæmingarbúnaðinn. Efnið kemur í veg fyrir að undirlagið seytili niður í festingarvökvann en mítlarnir komast burt úr sýninu. Hitunin er hafin eftir að mælingaglösnum hefur verið komið fyrir. Ljúka skal flæmingu eftir 48 klst. Mælingaglös með festingarvökva eru fjarlægð og mítlar taldir með krufningarsmásjá.

Sýnt skal hafa verið fram á skilvirkni valdrar aðferðar til flæmingar einu sinni eða tvisvar á ári með því að nota ílát sem innihalda þekktan fjölda ungvíðis og fullvaxinna míta sem geymdir eru í ómeðhöndluðu prófunarundirlagi. Skilvirknin skal vera $\geq 90\%$ að meðaltali fyrir öll þroskastig sameiginlega.

Flæmingarbúnaður af Tullgren-tegund



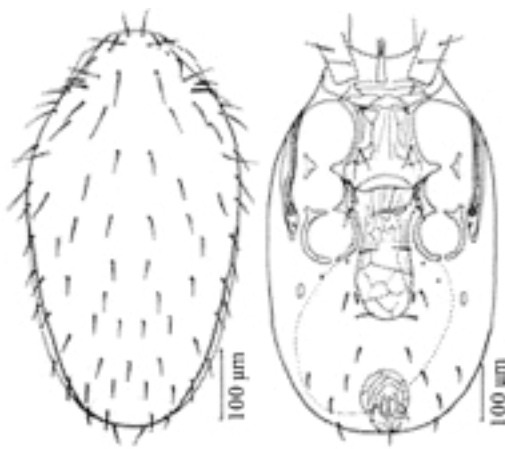
Hvernig á að undirbúa prófunarmælingaglasíð eftir að prófun er lokið, áður en flæming fer fram



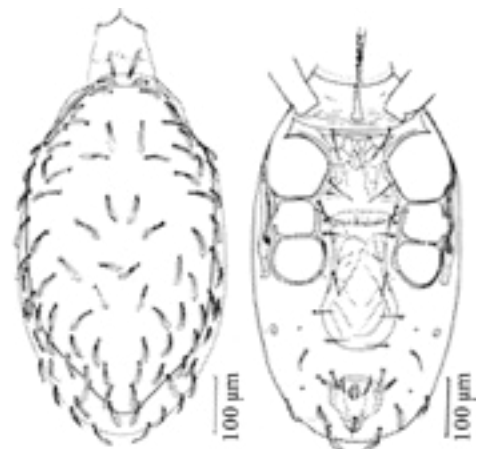
6. viðbætur

Sanngreining á *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

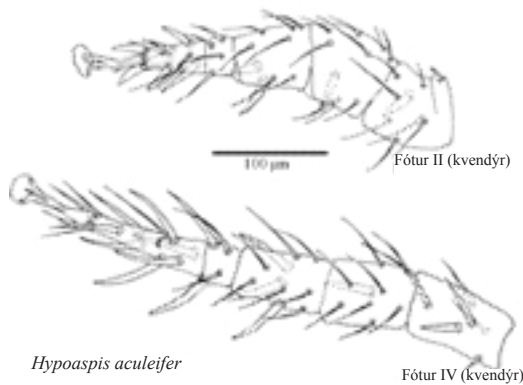
Undirflokkur/ættbálkur/ undirættbálkur:	Ætt:	Ættkvísl/undirættkvísl/tegund:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>
Höfundur og dagsetning:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 January 2007	
Heimildir sem eru notaðar:	<p>Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523.</p> <p>Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp.</p> <p>Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.</p>	
Ákvarðandi einkenni:	<p>Þekja (e. <i>tectum</i>) með ávölum, tenntum jaðri; grópir á neðri vör með fleiri en sex smátönnum (e. <i>denticles</i>); öftustu burstir á baki á Z4 ekki mjög langar; bakburstir burstalagaðar; kynfæraskjöldur eðlilegur, ekki mjög stækkaður og nær ekki að raufarskildi (e. <i>anal shield</i>); engar óparaðar burstir á aftasta hluta bakskjaldar; fætur II og IV með nokkrum gildum stórburstum (e. <i>macrosetae</i>); bakburst Z5 um það bil tvöfalt lengri en J5; fastur liður á klóskærum með 12-14 tönnum og hreyfanlegur liður með 2 tönnum; bolur (e. <i>idiosoma</i>) 520–685 µm langur</p> <p><i>Hypoaspis miles</i> er einnig notaður í lífrænar varnir og gæti verið ruglað saman við <i>H. aculeifer</i>. Meginmismunurinn er:</p> <p><i>H. miles</i> er af undirættkvíslinni <i>Cosmolaelaps</i> og er með hniflaga burstir á baki en <i>H. aculeifer</i> er aftur á móti af undirættkvíslinni <i>Geolaelaps</i> og er með burstalaga bakburstir.</p>	



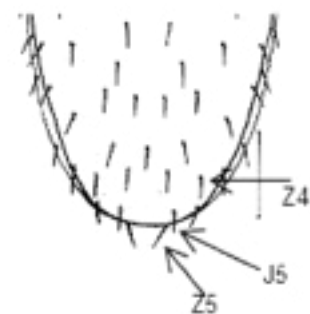
Hypoaspis aculeifer eftir Hughes, 1976



Hypoaspis miles eftir Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer
Upphaflegar teikningar eftir F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
bakskjöldur með einkennandi burst

7. viðbætur

Grunnupplýsingar um líffræði *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer tilheyrir ættinni Lealapidæ, ættbálkinum Acari (mítlar), undirflokknum Arachnida, ættflokknum Arthropoda. Þeir lifa í alls konar jarðvegi og nærast á öðrum mítlum, þráðormum, pottormum og stökkmori (26. heimild). Ef fæðuskortur verður bregða þeir á sjálfsafrán (27. heimild). Skrokkur ránmítla skiptist í bol (idiosoma) og haus (gnathosoma). Að því er varðar skrokkinn er ekki hægt að greina hreina skiptingu bolsins milli frambols (prosoma) og afturbols (opisthosoma). Á hausnum (gnathosoma) eru verkfæri til að nærast með s.s. þreififar og klóskæri. Klóskærin eru þrískipt og sett mismunandi löguðum tönnum. Auk þess að nærast með klóskærunum nota karldýrin þau aðallega til að flytja sáðbera (e *spermatophore*) sína yfir til kvendýranna. Bakskjöldur hylur bolinn að mestu. Stór hluti bolsins á kvendýrunum er fyrir æxlunarfærin sem eru sérstaklega áberandi stuttu fyrir losun eggja. Kviðlægt eru tveir skildir, brjóst- og kynfæraskjöldur. Á öllum fótum eru burstir og broddar. Burstirnar eru notaðar til að ná fötfestu á hreyfingu í eða ofan á jarðveginum. Fyrsta fótaparið er aðallega notað sem fálmar. Annað fótaparið er ekki aðeins notað til hreyfingar heldur einnig til að halda bráð fastri. Broddarnir á fjórða fótaparinu geta verið til verndar og einnig sem „hreyfill“ (28. heimild). Karldýrin eru 0,55–0,65 mm löng og veга 10–15 µg. Kvendýrin eru 0,8–0,9 mm löng og veга 50–60 µg (8. og 28. heimild) (Mynd 1).

Mynd 1

Kvendýr, karldýr, fyrsta stigs gyðlur og lirlur *H. aculeifer*.

Mítlarnir verða kynþroska við 23 °C, annars vegar eftir 16 daga (kvendýr) og hins vegar eftir 18 daga (karldýr) (6. heimild). Kvendýrin flytja sáðfrumurnar gegnum kynopið og þaðan yfir í eggjakerfið. Sæðið þroskast í eggjakerfinu og er geymt þar. Frjövgun verður ekki fyrir en að sæðið hefur náð fullum þroska í eggjakerfinu. Kvendýrin losa frjövguð eða ófrjövguð egg í köggjum eða hvert fyrir sig, helst í sprungum eða holum. Kvendýr sem hafa makast geta eignast ungvíði af báðum kynjum en úr eggjum kvendýra sem ekki hafa makast klekst eingöngu karlkyns ungvíði. Við þroskun fer dýrið gegnum fjögur stig þar til það er fullvaxið (egg — lirlur, lirlur — fyrsta stigs gyðla, fyrsta stigs gyðla — annars stigs gyðla, annars stigs gyðla — fullvaxið dýr).

Eggið er mjólkurhvítt, glært og aflangt og u.þ.b. 0,37 mm á lengd með föstum hjúpi. Samkvæmt 8. heimild er stærð lirlfanna á bilinu 0,42–0,45 mm. Þær eru einungis með þrjú pör af fótum. Á haushlutanum þroskast þreififar og klóskæri. Klóskærin, sem eru með nokkrar litlar tennur, eru notuð til að klekjast úr eggjunum. Eftir fyrstu hamskipti, 1–2 dögum eftir klak, þroskast fyrsta stigs gyðlur. Þær eru einnig hvítar, 0,45–0,62 mm að stærð (8. heimild), og eru með fjögur pör af fótum. Tennur á klóskærunum eru fullþroskaðar. Frá og með þessu stigi byrja mítlarnir að leita sér að fæðu. Af þessum sökum er stungið á skurn bráðarinnar með klóskærunum og seyti til aukalegrar meltingar er sprautað inn í bráðina. Eftir það getur mítillinn sögið upp fæðumaukið. Einnig er hægt að nota klóskærin til að rífa stærri hluta út úr fæðuköggjum (28. heimild). Eftir ein hamskipti í viðbót þroskast annars stigs gyðlur. Þær eru 0,60–0,80 mm (8. heimild) að stærð og gular yfir í ljósbrúna að lit. Frá og með þessu stigi er unnt að aðgreina karldýr og kvendýr. Eftir frekari hamskipti, en á meðan eru dýrin óvirk og brúni skjöldurinn að vaxa (u.þ.b. eftir 14 daga), eru mítlarnir fullvaxnir (28.–30. heimild). Líftími þeirra er á bilinu 48–100 dagar við 25 °C (27. heimild).

8. viðbætur

Samantekt og tímaáætlun fyrir helstu aðgerðir sem gera þarf til að framkvæma Hypoaspis-prófunina

Tími (dagar) upphaf prófunar = dagur 0	Aðgerð/verkefni
Dagur –35 til –28	Kvendýr eru flutt úr stofnrækt yfir í hrein ílát til að hefja samstillingu 2 dögum síðar: kvendýr fjarlægð Tvisvar eða þrisvar í viku: nægilegt fóður gefið
Dagur – 5 (+/-2)	Tilbúinn jarðvegur tilreiddur
Dagur – 4 (+/-2)	Vatnsheldni tilbúins jarðvegs ákvörðuð Þurrkað yfir nótt Næsti dagur: sýni vegin og vatnsheldni reiknuð
Dagur – 4 (+/-2)	Tilbúinn jarðvegur forrakabættur til að ná 20–30% vatnsheldni
Dagur 0	Prófun hafin: prófunaríðefni bætt í tilbúinn jarðveg 10 kvendýr sett í hverja samhliða prófun Hver samhliða prófun vegin Ólífrænar samhliða prófanir settar upp fyrir rakainnihald og sýrustig, 2 samhliða prófanir fyrir hverja meðhöndlun Rakasamanburður þurrkaður yfir nótt Næsti dagur: rakasamanburður veginn Næsti dagur: sýrustig þurrkaðra ólífrænna samanburðarprófana mælt
3., 6., 9. og 12. dagur (u.þ.b.)	Nægur fjöldi lífvera, sem eru bráð, er settur í hverja samhliða prófun Hver samhliða prófun vegin og að lokum bætt við vatni sem hefur gufað upp
Dagur 14	Prófun hætt, komið af stað flæmingu í öllum samhliða prófunum svo og í samanburði til að kanna skilvirkni flæmingar Vatnsinnihaldssamanburður þurrkaður yfir nótt Næsti dagur: vatnsinnihaldssamanburður veginn Næsti dagur: sýrustig þurrkaðra samanburðarprófana mælt
Dagur 16	Flæmingu hætt
Dagur 16 +	Fjöldi fullvaxinna dýra og ungvíðis í útdregna efninu skráður Gerð grein fyrir niðurstöðum á töflueyðublaði Gerð grein fyrir prófunaraðferð á blöðum fyrir aðferðarlýsingu prófunar

C.37. RANNSÓKN Á FISKUM Í 21 DAG: SKAMMTÍMASKIMUN FYRIR ESTRÓGEN- OG ANDRÓGENVIRKNI OG ARÓMATASAHÖMLUN

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 230 um prófanir (2009). Þörf til að þróa og fullgilda rannsókn á fiskum þar sem hægt er að greina tiltekin íðefni sem hafa áhrif á innkirtlastarfsemi sprettur af áhyggjum af því að magn íðefna í umhverfinu geti valdið skaðlegum áhrifum, bæði á menn og villtar lífverur, vegna milliverkunar þessara íðefna á innkirtlakerfið. Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að forgangsáðgerð árið 1998 til að endurskoða fyrirbyggjandi viðmiðunarreglur og þróa nýjar viðmiðunarreglur fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnum. Einn þátturinn í aðgerðinni var að þróa viðmiðunarreglur um skimun fyrir íðefnum sem hafa áhrif á innkirtlakerfi fiska. Skimunargreining á innkirtlastarfsemi fiska í 21 dag fór í gegnum umfangsmikið fullgildingarferli sem samanstóð af fjölsetrarannsóknum með völdum íðefnum til að sýna fram á mikilvægi og áreiðanleika hennar til að greina íðefni sem hafa hamlandi áhrif á estrógen og arómatasa (1.–5. heimild) í þeim þremur tegundum fiska sem voru rannsakaðar (breiðkollur, japanskur rískarpi og sebradanni); greining á andrógenvirkni er möguleg í breiðkollu og rískarpa en ekki í sebradanna. Með þessari aðferð er ekki hægt að greina and-andrógenvirk íðefni. Fullgildingarstarfið var jafningjarýnt af nefnd sérfræðinga sem landsbundnir samræmingaraðilar um prófunarleiðbeiningaáætlunina tilnefndu (6. heimild). Rannsókninni er ekki ætlað að greina sértæk gangvirki hormónatruflana vegna þess að tilraunadýrin eru með óskaddaðan undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxli sem gæti brugðist við íðefnum sem hafa áhrif á mismunandi svæði á þeim öxli. Skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum (OECD TG 229) tekur til frjósemi og, eins og við á, vefjameinafræðilegrar rannsóknar á kynkirtlum hjá breiðkollu sem og til allra endapunkta sem eru teknir með í þessari prófunaraðferð. Í OECD TG 229 er að finna skimun fyrir íðefnum sem hafa áhrif á æxlun með margs konar gangvirki, þ.m.t. innkirtlakerfinu. Þetta skal hafa í huga áður en heppilegasta prófunaraðferðin er valin.
2. Í þessari prófunaraðferð er lýst skimunargreiningu í lífi þar sem kynþroska hængum og hrygnum er haldið saman og látin verða fyrir váhrifum af íðefni í takmarkaðan tíma á lífsferli þeirra (21 dagur). Við lok 21. dags váhrifatímabilsins, háð tegundum sem eru notaðar, eru eitt eða tvö lífmerki mæld sem endapunktur í karl- og kvendýrum sem eru mælikvarðar á estrógenvirkni, arómatasahömlun eða andrógenvirkni prófunariðefnisins; þessir endapunktur eru vítellógenín og annars stigs kyneinkenni. Vítellógenín er mælt í breiðkollu, japönskum rískarpa og sebradanna en annars stigs kyneinkenni eru einungis mæld í breiðkollu og japönskum rískarpa.
3. Þessi lífgreining er notuð sem skimunargreining í lífi m.t.t. tiltekins verkunarháttar innkirtla og beiting hennar skal skoðuð með tilliti til hugtakamma Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum, (e. *OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) (28. heimild).

ATRÍÐI, SEM ÞARF AÐ HAGA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

4. Vítellógenín er yfirleitt framleitt í lifur eggþærra kvenkyns hryggdýra til að bregðast við innrænu estrógeni í blóðrásinni. Það er forefni eggjarauðprótína og þegar lifrin hefur framleitt það færast það með blóðrásinni í hrognasekkina þar sem hrogn sem eru að þroskast, taka það upp og breyta því. Vítellógenín er næstum ógreinanlegt í blóðvökva óþroskaðra hænga og hrygna því þau hafa ekki nóg af estrógeni í blóðrásinni; þó er lifrin fær um að mynda og seyta vítellógenín til að bregðast við útrænni estrógenörvun.
5. Mælingar á vítellógeníni þjóna þeim tilgangi að greina íðefni með ýmiss konar estrógenverkunarhætti. Greining á estrógenvirkum íðefnum er möguleg með því að mæla vítellógenínvirkjun í hængum og hún hefur oft verið skjalfest í ritrýndum vísindaritum (t.d. 7. heimild). Einnig hefur verið sýnt fram á vítellógenínvirkjun í kjölfar váhrifa af arómavirkjanlegum (e. *aromatizable*) andrógenum (8.–9. heimild). Minnkun á magni estrógens í blóðrás kvendýra, t.d. með arómatasahömlun sem umbreytir innrænum andrógenum í náttúrulega estrógenið 17 β -estradiól, veldur minnkun á magni vítellógeníns sem er notað til að greina íðefni sem eru með arómatasahamlandi eiginleika (10.–11. heimild). Líffræðilegt mikilvægi vítellógenínsvörunar í kjölfar estrógen-/arómatasahömlunar hefur verið staðfest og víða skjalfest. Þó er mögulegt að framleiðsla á vítellógeníni hjá kvendýrum geti einnig orðið fyrir áhrifum af almennum eiturhrifum og verkunarháttum eiturhrifa sem hafa ekki áhrif á innkirtla, t.d. eiturhrifum á lifur.

6. Nokkrar mæliaðferðir hafa verið þróaðar með góðum árangri og staðlaðar til notkunar að staðaldri. Sú er raunin með tegundarbundnar ELISA-prófunaraðferðir þar sem ónæmisfrumuefnafræði er notuð til að magnákvæða vítellógenín sem myndast í litlum blóð- eða lifrarsýnum sem eru tekin úr einstökum fiskum (12.–18. heimild). Tekið er sýni úr blóði breiðkolls eða sebradanna eða úr jafningi úr haus/sporði og úr lifur riskarpa til að mæla vítellógenín. Í riskarpa er góð fylgni milli vítellógeníns sem mælist í blóði og í lifur (19. heimild). Í 6. viðbæti koma fram þær aðferðir sem mælt er með við söfnun sýna til greiningar á vítellógeníni. Sett til að mæla vítellógenín fást víða; slík sett skulu grundvallast á fullgilttri tegundarbundinni ELISA-aðferð.
7. Annars stigs kyneinkenni í hængum af tilteknum tegundum eru sýnileg utan á, mælanleg og næm fyrir styrk innrænna andrógena í blóðrásinni; sú er raunin með breiðkoll og riskarpa en ekki að því er varðar sebradanna sem býr ekki yfir mælanlegum annars stigs kyneinkennum. Kvendýr halda getu til að mynda karlkyns, annars stigs kyneinkenni þegar þau verða fyrir váhrifum af andrógenvirkum íðefnum í vatni. Fjölmargar rannsóknir eru tiltækar í birtum vísindaskrifum þar sem fjallað er um þess konar svörun í breiðkoll (20. heimild) og riskarpa (21. heimild). Minnkun á annars stigs kyneinkennum hjá karldýrum skal túlka með varúð vegna lítills tölfræðilegs styrks og skal byggð á sérfræðiáliti og vægi rökstuddra vísbendinga. Notkun sebradanna í þessari rannsókn er þeim takmörkunum háð að mælanleg annars stigs kyneinkenni, sem eru næm fyrir andrógenvirkum íðefnum, eru ekki fyrir hendi.
8. Hjá breiðkoll er fjöldi pörunarhnúta (*e. nuptial tubercles*) á trýni hrygna meginvísbendirinn um útræn andrógenvirk váhrif. Hjá riskarpanum er fjöldi tota helsta merkið um útræn váhrif á hrygnur af andrógenvirkum íðefnum. Í 5. viðbæti A og 5. viðbæti B eru tilgreindar þær aðferðir sem mælt er með að fylgt sé við mat á kyneinkennum hjá breiðkoll og riskarpa, eftir því sem við á.
9. Skilgreiningar sem eru notaðar í þessari prófunaraðferð er að finna í 1. viðbæti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

10. Í rannsókninni eru hængar og hrygnur í æxlunarástandi látin verða fyrir váhrifum saman í prófunarilátum. Staða þeirra sem fullvaxinna dýra í æxlunarástandi gerir það kleift að greina auðveldlega milli kynja og þar með að gera kynjatengdar greiningar á hverjum endapunkti og tryggir næmi þeirra gagnvart útrænum íðefnum. Við lok prófunar er kynið staðfest með stórsærrri rannsókn á kynkirtlum eftir að afturbolurinn er opnaður kviðlægt með skærum. Yfirlit um viðeigandi skilyrði lífgreininga er að finna í 2. viðbæti. Yfirlitt er rannsóknin hafin með fiski sem tekinn er úr stofni sem er tilbúinn til hrygningar; ekki skal nota fisk sem er orðinn gamall. Leiðbeiningar um aldur fiska og æxlunarástand eru gefnar í liðnum um val á fiskum. Rannsóknin er framkvæmd með því að nota þrjú váhrifastyrkleika íðefnis sem og vatnssamanburð og samanburð með leysi, ef nauðsyn krefur. Að því er varðar riskarpa og sebradanna eru notuð tvö ker eða ker fyrir samhliða prófun fyrir hverja meðhöndlun (hvert ker inniheldur 5 hænga og 5 hrygnur) en að því er varðar breiðkoll eru notuð fjögur ker eða ker fyrir samhliða prófun fyrir hverja meðhöndlun (hvert ker inniheldur 2 hænga og 4 hrygnur). Þetta er til að taka tillit til óðalsatferlis breiðkollshænga en halda styrk prófunarinnar fullnægjandi um leið. Váhrifin standa yfir í 21 dag og sýnataka úr fiskum fer fram á 21. váhrifadegi.
11. Við sýnatöku á 21. degi eru öll dýrin aflífuð á mannúðlegan hátt. Annars stigs kyneinkenni eru mæld í breiðkoll og riskarpa (sjá 5. viðbæti A og 5. viðbæti B); tekin eru blóðsýni til að ákvarða vítellógenín í sebradanna og breiðkoll, að öðrum kosti er hægt að taka haus/sporð til að ákvarða vítellógenín í sebradanna (6. viðbæti); lifrín er tekin til að greina vítellógenín í riskarpa (6. viðbæti).

VIÐMIÐANIR FYRIR SAMÞYKKT PRÓFUNAR

12. Prófunarniðurstöður eru aðeins samþykktar ef eftirfarandi skilyrði eru uppfyllt:

- dánarhlutfall í vatnssamanburði (eða samanburði með leysi) skal ekki fara yfir 10% við lok váhrifatímabilsins,
- styrkur uppleysts súrefnis skal vera a.m.k. 60% af metnunargildi lofts á öllu váhrifatímabilinu,

- ekki má muna meira á vatnshitastiginu milli prófunarílata en $\pm 1,5$ °C á hverjum tíma á váhrifatímabilinu og skal viðhalda honum innan 2 °C frá því hitasviði sem er tilgreint fyrir prófunartegundina (2. viðbætur),
- sönnunargögn skulu liggja fyrir til að sýna fram á að styrkleikum prófunaríðefnisins í lausn hafi verið viðhaldið á fullnægjandi hátt innan $\pm 20\%$ af meðaltali mæligilda.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

13. Venjulegur rannsóknarstofubúnaður og einkum eftirfarandi:
 - a) súrefnis- og sýrustigsmælar,
 - b) búnaður til að ákvarða hörku vatns og basavirkni,
 - c) fullnægjandi tæki til að stýra hita, helst með stöðugri vöktun,
 - d) ker úr efnafræðilega óvirku efni og hæfilega stór miðað við ráðlagt hleðsluhlutfall og þéttleika (sjá 2. viðbætur),
 - e) hrygningarundirlag fyrir breiðkoll og sebradanna, nauðsynlegar upplýsingar eru gefnar í 4. viðbætur,
 - f) nægilega nákvæm vog (þ.e. nákvæmni upp á $\pm 0,5$ mg).

Vatn

14. Nota má hvers kyns vatn sem prófunarvatn svo fremi prófunartegundin sýni þar nægilega lifun og vöxt til langs tíma. Gæði vatnsins skulu vera stöðug allan prófunartímann. pH-gildið skal vera á bilinu 6,5 til 8,5 en í hverri prófun skal frávik þess ekki vera meira en $\pm 0,5$ pH-stig. Til að tryggja að þynningarvatnið hafi ekki óæskileg áhrif á niðurstöður prófunarinnar (t.d. með því að mynda efnaflóka með prófunaríðefninu) skal taka sýni til greiningar með reglulegu millibili. Mælingar skulu gerðar á þungmálum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), helstu plúsjónum og mínusjónum (t.d. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- og SO_4^{2-}), varnarefnum (t.d. heildarmagni fosfórlífræna og klórlífræna varnarefna), heildarmagni lífræns kolefnis og heildarmagni svifagna t.d. þriðja hvern mánuð ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Ef sýnt hefur verið fram á að vatnsgæði hafi verið stöðug í a.m.k. eitt ár geta mælingar verið strjálí (t.d. á sex mánaða fresti). Nokkrir efnaeiginleikar viðunandi þynningarvatns eru tilgreindir í 3. viðbætur.

Prófunarlausnir

15. Prófunarlausnir af þeim styrk, sem valinn er hverju sinni, fást með því að þynna stofnlausn. Heppilegast er að tilreiða stofnlausnina með því að prófunaríðefninu sé einfaldlega blandað, eða það sé hrist, saman við þynningarvatnið á vélrænan hátt (t.d. með hræri- eða úthljóðsbúnaði). Nota má metunarsúlur (leysnisúlur) til að búa til stofnlausn af hæfilegum styrk. Ekki er mælt með að nota leysi sem burðarefni. Ef nauðsynlegt er að nota leysi skal þó keyra samhliða samanburðarprófun með leysi með sama leysisstyrk og í meðhöndlunum með íðefni. Að því er varðar íðefni sem er erfitt að gera prófanir á getur leysir verið besta lausnin tæknilega séð; fletta skal upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir í vatni á eiturhrifum íðefna og blandna, sem erfitt er að gera prófanir á (e. *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (22. heimild). Val á leysi ákvarðast af efnafræðilegum eiginleikum íðefnisins. Fara skal eftir hámarkinu 100 µl/l sem mælt er með í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar. Í nýlegri endurskoðun (23. heimild) er þó lögð áhersla á viðbótarathugunarefni í tengslum við notkun leysa til prófana á starfsemi innkirtla. Þess vegna er mælt með því að styrkur leysisins, ef hann er nauðsynlegur, sé lágmarkaður þegar það er tæknilega mögulegt (háð eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnis).
16. Nota skal prófunarkerfi með gegnumstreymi. Slíkt kerfi skammtar stöðugt stofnlausn með prófunaríðefninu og þynnir hana (t.d. skammtaðæla, hlutfallsþynningarbúnaður eða metunarkerfi) í því skyni að flytja prófunarefni af mismunandi styrk í prófunarkerfin. Kanna skal streymi stofnlausna og þynningarvatns reglulega, helst daglega, alla prófunina og í allri prófuninni skal frávik í streyminu ekki vera meira en 10%. Þess skal gætt að forðast notkun á plastslöngum eða öðru efni af litlum gæðum sem gæti innihaldið líffræðilega virk íðefni. Þegar efni er valið í gegnumstreymiskerfið skal hafa í huga hugsanlegt ásgöngu prófunaríðefnisins á viðkomandi efni.

Eldi fisksins

17. Prófunarfiskurinn skal valinn úr hópi rannsóknarstofustofns, helst úr einum stofni, sem hefur verið aðlagður í a.m.k. tvær vikur fyrir prófunina við skilyrði þar sem gæði vatns og lýsing eru svipuð því sem verður í prófuninni. Mikilvægt er að hleðsluhlutfall og þéttleiki dýranna (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti) hæfi þeirri tegund sem er notuð í prófuninni (sjá 2. viðbæti).
18. Að loknu 48 klst. aðlögunartímabili skal skrá dánartíðni og styðjast við eftirfarandi viðmiðanir:
 - dánartíðni meiri en 10% af stofninum á sjö dögum: hafna skal allri lotunni,
 - dánartíðni milli 5% og 10% af stofninum: aðlögun í sjö daga til viðbótar; ef dánartíðnin er meiri en 5% á næsta sjö daga tímabili: hafna skal allri lotunni,
 - dánartíðni undir 5% af stofninum á sjö dögum: lotan er ásættanleg.
19. Meðan á aðlögunartímabilinu, tímabilinu á undan váhrifum eða váhrifatímabilinu stendur skal ekki meðhöndla fiska við sjúkdómum.

Tímabil á undan váhrifum og val á fiskum

20. Mælt er með að dýrunum sé komið fyrir í ílátum, sem eru svipuð þeim sem eru notuð í prófuninni sjálfri, í vikutímabil á undan váhrifum. Fóðra skal fiska að vild allan eldistímamann og meðan váhrifafasinn stendur yfir. Váhrifafasanum er komið af stað með fullvöxnum fiskum með kynbundna tvíbreytni úr rannsóknarstofubirgðum af dýrum sem eru kynþroska (t.d. að því er varðar breiðkoll og rískarpa með greinilega sýnileg annars stigs kyneinkenni) og virk í hrygningu. Breiðkollar skulu, einungis að meginreglu til (og ekki til sérathugunar og aðskilið því að fylgjast með æxlunarástandi tiltekinnar fiskalotu), vera u.þ.b. 20 (\pm 2) vikna gamlir að því gefnu að þeir hafi verið ræktaðir við 25 ± 2 °C allan sinn líftíma. Japanskir rískarpar skulu vera u.þ.b. 16 (\pm 2) vikna gamlir að því gefnu að þeir hafi verið ræktaðir við 25 ± 2 °C allan sinn líftíma. Sebradannar skulu vera u.þ.b. 16 (\pm 2) vikna gamlir að því gefnu að þeir hafi verið ræktaðir við 26 ± 2 °C allan sinn líftíma.

TILHÖGUN PRÓFUNAR

21. Þrír styrkleikar prófunaríðefnis, einn samanburður (vatn) og, ef þörf krefur, einn samanburður með leysi eru notaðir. Hægt er að greina gögnin til að ákvarða tölfærðilega marktækan mun milli svörunar í meðferðar- og samanburðarhóp. Þessar greiningar munu upplýsa um það hvort þörf er á frekari prófunum á íðefninu m.t.t. skaðlegra áhrifa til lengri tíma (þ.e. lifun, þroskun, vöxtur og æxlun) umfram þær sem notaðar eru í áhættumat (24. heimild).
22. Að því er varðar sebradanna og rískarpa skal á 21. degi tilraunarinnar taka sýni úr hængum og hrygnum á hverju meðhöndlunartígi (5 hængur og 5 hrygnur í hverri af samhlíða prófununum tveimur) og úr samanburðinum til að mæla vítellógenín og annars stigs kyneinkenni, eftir atvikum. Að því er varðar breiðkoll skal á 21. degi váhrifa taka sýni úr hængum og hrygnum (2 hængum og 4 hrygnum í hverri af samhlíða prófunum fjórum) og úr samanburðinum til að mæla vítellógenín og annars stigs kyneinkenni.

Val á prófunarstyrkleikum

23. Að því er varðar þessa prófun skal fastsetja hæsta prófunarstyrk við hámarksþolsstyrk (MTC), sem er ákvarðaður út frá ákvörðun á styrkbilum eða öðrum gögnum um eiturrhif, eða 10 mg/l eða hámarksleysni í vatni, eftir því hvert gildanna er lægst. Hámarksþolsstyrkur er skilgreindur sem hæsti prófunarstyrkur íðefnisins sem hefur í för með sér innan við 10% dánartíðni. Með þessari nálgun er gengið út frá því að til séu gögn um eiturrhif, sem byggð eru á athugunum, eða önnur gögn um eiturrhif sem hægt er að áætla hámarksþolsstyrkinn út frá. Mat á hámarksþolsstyrk getur verið ónákvæmt og krefst alla jafna sérfræðiálits af einhverju tagi.
24. Nauðsynlegt er að nota þrjá prófunarstyrkleika, á styrkbilum með föstum stuðli sem er ekki yfir 10, og samanburð með þýnningarvatni (og samanburð með leysi, ef þörf krefur). Mælt er með röð bilstuðla milli 3,2 og 10.

VERKFERLI

Val á prófunarfiski og vigtun hans

25. Brýnt er að breytileiki í þyngd fiskanna í upphafi rannsóknarinnar sé sem minnstur. Heppilegt stærðarbil fyrir þær mismunandi tegundir, sem mælt er með fyrir þessa prófun, er tilgreint í 2. viðbæti. Þyngd einstakra hænga og hrygna í allri lotunni, sem er notuð í prófuninni, má í upphafi prófunar helst ekki víkja meira en $\pm 20\%$ frá meðalþyngd sama kyns. Mælt er með því undirrtak fiskstofna sé vegið, áður en prófunin er gerð, til þess að áætla meðalþyngdina.

Váhrifaskilyrði*Tímalengd*

26. Lengd prófunarinnar er 21. dagur í kjölfar tímabils á undan váhrifum. Tímabilið á undan váhrifum, sem mælt er með, er ein vika.

Fóðrun

27. Fiskurinn skal fóðraður að vild með viðeigandi fóðri (2. viðbætur) og nægilega oft til þess að viðhalda líkamsástandi hans. Þess skal gætt að örverur nái ekki að þrífast og að vatnið verði ekki gruggugt. Að meginreglu til má skipta daglegum skammti í tvo eða þrjá jafnstóra skammta til að gefa í fleiri föðrunum á dag með minnst 3 klst. millibili. Einn stærri skammtur er ásættanlegur, einkum um helgar. Fiskunum skal ekki gefið neitt fóður í 12 klukkustundir áður en sýni er tekið/krufning fer fram.
28. Meta skal fiskafóður m.t.t. þess hvort aðskotaefni eru í því, s.s. klórlífræn varnarefni, fjölhringa, arómatísk vetniskolefni, fjöklóruð bifenyli. Forðast skal fóður með hækkuð gildi plöntuestrógena sem tefla svörun rannsóknarinnar við þekktum estrógenörvum (t.d. 17-betaestradióli) í tvísýnu.
29. Fjarlægja skal óetið fóður og saurefni úr prófunarílátunum a.m.k. tvisvar í viku, t.d. með því að hreinsa botn hvers kers vandlega með vökvasugu.

Ljós og hiti

30. Haga skal ljóslosum og vatnshitastigi þannig að henti þeirri tegund sem er prófuð (sjá 2. viðbæti).

Tíðni magngreininga og mælinga

31. Áður en váhrifatímabilið hefst skal tryggja að iðefnagjafabúnaður starfi rétt. Allar greiningaraðferðir sem þörf er á skulu staðfestar, þ.m.t. að fullnægjandi þekking sé á efnafræðilegum stöðugleika í prófunarkerfinu. Meðan á prófuninni stendur er styrkur prófunariðefnisins ákvarðaður með reglulegu millibili sem hér segir: kanna skal streymi þynningar- og eiturefnastofnlausnar, helst daglega en að lágmarki tvisvar í viku, og frávikið skal ekki vera meira en 10% í allri prófuninni. Mælt er með því að raunstyrkleikar prófunariðefnisins séu mældir í öllum ílátum við upphaf prófunarinnar og vikulega eftir það.
32. Mælt er með því að niðurstöðurnar séu byggðar á mældum styrkleikum. Ef styrk prófunarefnis í lausn hefur verið haldið á fullnægjandi hátt innan $\pm 20\%$ af nafnstyrk í allri prófuninni mega niðurstöðurnar þó annað hvort grundvallast á nafngildum eða mældum gildum.
33. Ef til vill þarf að sía sýni (t.d. með síu með opstærðinni 0,45 μm) eða setja þau í skilvindu. Ef þess þarf er skiljun það verklag sem mælt er með. Ef prófunarefnið ásogast ekki við síur getur síun hins vegar einnig verið viðunandi aðferð.

34. Í prófuninni skal mæla uppleyst súrefni, hitastig og sýrustig í öllum prófunarílátum a.m.k. einu sinni í viku. Mæla skal heildarhorku og basavirkni í samanburðarílátunum, og í einu íláti þar sem styrkurinn er mestur, a.m.k. einu sinni í viku. Æskilegt er að vakta hitann stöðugt í a.m.k. einu prófunaríláti.

Athuganir

35. Nokkrar almennar svananir (t.d. lifun) og mikilvægar líffræðilegar svananir (t.d. vítellógeningildi) eru metnar meðan rannsóknin stendur yfir eða þegar henni lýkur. Mælingum og mati á þessum endapunktum og notagildi þeirra er lýst hér á eftir.

Lifun

36. Fiskurinn skal skoðaður daglega á prófunartímabilinu og skrá skal alla dauða fiska og fjarlægja þá eins fljótt og unnt er. Ekki skal setja nýja fiska í stað þeirra sem drepast, hvorki í samanburðar- eða meðhöndlunarílát. Ákvarða skal kyn fiska sem drepast meðan prófunin stendur yfir með stórsærri rannsókn á kynkirtlum.

Atferli og útlit

37. Allt óeðlilegt atferli skal skráð (miðað við samanburð); þetta getur tekið til einkenna um almenn eiturrhif, þ.m.t. oföndun, ósamstillt sund, jafnvægistap og ódæmigerð ró eða át. Því til viðbótar skal skrá ytri afbrigðileika (s.s. blæðing, óeðlilegur litur). Slík merki um eiturrhif skal kanna gaumgæfilega þegar gögn eru túlkuð þar eð þau geta verið vísbending um að lifmerki um starfsemi innkirtla séu ekki áreiðanleg við þá styrkleika. Atferlisfræðilegar athuganir af þessu tagi geta einnig gefið nytsamlegar eigindlegar upplýsingar sem geta haft áhrif á mögulegar kröfur um prófanir á fiski í framtíðinni. Til dæmis hefur orðið vart við óðalsárargirni við várhif af andrógenum hjá venjulegum breiðkollshængum eða breiðkollshrygnum með kyneinkenni hænga; hjá sebradanna dregur úr eða bælist eðlislegt pörunar- og hrygningaratferli eftir dagrenningu vegna estrógenvirkra eða and-andrógenvirkra váhrifa.
38. Þar eð sumir þættir í útliti (aðallega litur) geta breyst hratt við meðhöndlun er mikilvægt að gera eigindlegar athuganir áður en dýrin eru tekin úr prófunarkerfinu. Reynslan af breiðkoll fram að þessu bendir til þess að einhver íðefni sem hafa áhrif á innkirtlastarfsemi geti í upphafi framkallað breytingar á eftirfarandi ytri einkennum: skrokklit (ljós eða dökkur), litmynstri (lóðrétta rendur eru fyrir hendi) og skrokklögun (haus- og frambolshluti). Þess vegna skal fylgjast með útliti fisksins meðan prófunin stendur yfir og við lok rannsóknarinnar.

Aflifun fiska á mannúðlegan hátt

39. Á 21. degi, þ.e. við lok váhrifa, skal aflifa fiskinn á mannúðlegan hátt með viðeigandi magni af tríkaíni (tríkaímetansúlfónat, metakaín, MS-222 (CAS 886-86-2), 100–500 mg/l jafnað með 300 mg/l NaHCO₃ (natríumbíkarbónat, CAS 144-55-8) til að draga úr ertingu í slímhúð; síðan er tekið sýni úr blóði eða vef til að ákvarða vítellógenin, eins og útskýrt er í liðnum um vítellógenin.

Athugun á annars stigs kyneinkennum

40. Sum íðefni sem hafa áhrif á innkirtlastarfsemi geta framkallað breytingar á sértækum, annars stigs kyneinkennum (fjöldi pörunarhnúta á breiðkollshængum, totumyndun á riskarpahængum). Nánar tiltekið geta íðefni með tiltekinn verkunarhátt valdið óeðlilegum annars stigs kyneinkennum í dýrum af hinu kyninu; t.d. geta andrógenviðtakaörvar s.s. trenbólón, metýltestósterón og dihydrotéstósterón valdið því að breiðkollshrygnur myndi áberandi pörunarhnúta eða að totur myndist á riskarpahrygnum (11., og 20.–21. heimild). Einnig hefur verið greint frá því að estrógenviðtakaörvar geti fækkað pörunarhnútum og minnkað hnakkahnúðinn á fullvöxnum hængum (25.–26. heimild). Slíkar stórsæjar, formfræðilegar athuganir geta gefið nytsamlegar eigindlegar og meginlegar upplýsingar sem geta haft áhrif á mögulegar kröfur um prófanir á fiski í framtíðinni. Fjöldi og stærð pörunarhnúta á breiðkoll og totumyndun á riskarpa er hægt að telja beint eða, á þægilegri hátt, á varðveittum sýnishornum. Í 5. viðbæti A og 5. viðbæti B, eftir því sem við á, eru tilgreindar þær aðferðir sem mælt er með til að meta annars stigs kyneinkenni hjá breiðkoll og riskarpa.

Vítellógenín

41. Blóði er safnað úr sporðslagæð/bláæð með heparínmeðhöndlaðri hárpípu fyrir blóðkornaskil, (e. *heparinised microhematocrit capillary tubule*) eða að öðrum kosti með hjartaástungu með sprautu. Magn blóðs sem hægt er að safna, háð stærð fisksins, er yfirleitt á bilinu 5–60 µl úr hverjum einstaklingi fyrir sig að því er varðar breiðkoll og 5–15 µl úr hverjum einstaklingi fyrir sig að því er varðar sebradanna. Blóðvökvinn er aðskilinn frá blóðinu með skiljun og geymdur með prótínkljúfalötum við 80 °C þangað til hann er greindur m.t.t. vítellógeníns. Að öðrum kosti er lifrin úr rískarpanum notuð og hægt er að nota jafning úr haus-/sporði af sebradanna sem vefjagjafa til að ákvarða vítellógenín (6. viðbætur). Mælingar á vítellógeníni skulu byggjast á fullgilttri, raðkvæmri ELISA-aðferð þar sem notuð eru raðkvæmir vítellógenínstaðlar og raðkvæm mótEfni. Mælt er með því að nota aðferð sem getur greint vítellógeníngildi niður í örfá ng/ml af blóðvökva (eða ng/mg af vef) sem eru bakgrunnsgildin fyrir hænga sem hafa ekki orðið fyrir váhrifum.
42. Gæðaeftirlit með vítellógeníngreiningu fer fram með notkun staðla, blanksýna og greiningum á a.m.k. tvísýni. Keyra skal prófun á áhrifum frá efni við (áhrifum af þynningu sýnis) fyrir hverja ELISA-aðferð til að ákvarða lágmarksþynningarstuðul sýnisins. Hver ELISA-bakki, sem er notaður í vítellógeníngreiningu, skal innihalda eftirfarandi samanburðarsýni: a.m.k. 6 kvörðunarstaðla sem ná yfir röð þeirra vítellógenínstyrkleika sem búið er við og a.m.k. eitt blanksýni fyrir ósérhæfða bindigreiningu (greind í tvísýni). Gleypni þessara blanksýna skal vera minni en 5% af hámarksgleypni kvörðunarstaðalsins. Að minnsta kosti tveir deiliskammtar (tvísýni úr holubakka) af hverri þynningu sýnis eru greindir. Tvísýni úr holubakka með meira en 20% frávik skal greina aftur.
43. Fylgnistuðullinn (R^2) fyrir kvörðunarferla skal vera hærri en 0,99. Þó er mikil fylgni ekki nægileg til að tryggja fullnægjandi spá um styrkleika í öllum bilum. Til viðbótar við nægilega mikla fylgni kvörðunarferilisins skal styrkurinn í hverjum staðli, eins og hann er reiknaður út frá kvörðunarferilinum, vera á bilinu 70–120% af nafnstyrk hans. Ef nafnstyrkurinn leitar frá kvörðunaraðhvarfslínunni (t.d. við lægri styrkleika) getur verið nauðsynlegt að skipta kvörðunarferilinum í lítil og stór bil eða nota ólínulegt líkan til að gleypnigögnin komist fyrir með fullnægjandi hætti. Ef ferillinn er klofinn skal $R^2 > 0,99$ gilda fyrir báða hluta línunnar.
44. Greiningarmörk eru skilgreind sem styrkur lægsta efnagreiningarstaðals og magngreiningarmörk eru skilgreind sem styrkur lægsta efnagreiningarstaðals, margfaldaður með lægsta þynningarstuðlinum.
45. Hvern þann dag sem vítellógeníngreiningar eru framkvæmdar skal greina styrkingarsýni sem er gert með því að nota viðmiðunarstaðal milli prófana (7. viðbætur). Gerð verður grein fyrir hlutfallinu milli styrks sem búið er við og mælds styrks ásamt niðurstöðum úr hverri röð greininga sem eru framkvæmdar þann dag.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Mat á lífmerkjasvörum með dreifnigreiningu (ANOVA)

46. Til að sanngreina hugsanlega virkni íðefna á innkirtla er svörum milli meðhöndlunar- og samanburðarhópa borin saman með dreifnigreiningu. Ef notaður er samanburður með leysi skal gera viðeigandi tölfræðilega prófun til að bera saman samanburðina fyrir þynningarvatnið og leysinn fyrir hvern endapunkt. Leiðbeiningar um meðhöndlun á gögnum um samanburð þynningarvatns og leysis í síðari, tölfræðilegri greiningu er að finna í OECD, 2006c (27. heimild). Greina skal öll gögn um lífræðilega svörum og gera grein fyrir þeim aðskilið eftir kyni. Ef nauðsynlegar forsendur fyrir stikabundnum aðferðum eru ekki uppfylltar — ekki eðlileg dreifing (t.d. Shapiro-Wilks-prófun) eða misleit dreifni (Bartlett's- eða Levenes-prófun) — skal vega og meta hvort vörpun á gögnunum væri rétt til að gera dreifnina einsleita, áður en dreifnigreiningin er gerð, eða að nota vegna dreifnigreiningu. Hægt er að nota Dunnett's-prófun (stikabundin) eða margfaldan samanburð para eða Mann-Whitney með Bonferroni-aðlögun (óstikabundin) fyrir skammtasvörum sem er ekki einhalla. Hægt er að nota önnur tölfræðileg próf (t.d. Jonckheere-Terpstra-próf eða Williams-próf) ef skammtasvörum er u.þ.b. einhalla. Í 8. viðbæti er að finna tölfræðilegt flæðirit sem hjálpar við að ákveða hvaða tölfræðilegu prófun er hentugast að nota. Einnig er hægt að fá viðbótarupplýsingar í skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um gildandi nálganir við tölfræðilega greiningu gagna um vísitúrhrif (e. *OECD Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*) (27. heimild).

Skýrslugjöf um niðurstöður úr prófunum

47. Í rannsóknargögnum skal koma fram:

Prófunarstöð:

- ábyrgðaraðilar og rannsóknarábyrgð þeirra
- hver rannsóknarstofa skal hafa sýnt fram á hæfni við að nota röð dæmigerðra iðefna

Prófunariðefni:

- lýsing á eiginleikum prófunariðefnis
- eðlisástand og viðeigandi, eðlisefnafræðilegir eiginleikar
- aðferð við tilreiðslu prófunarstyrkleika og tíðni þeirra
- upplýsingar um stöðugleika og lífbrjótanleika

Leysir:

- lýsing á eiginleikum leysis (eðli, styrkur sem er notaður)
- rök fyrir vali á leysi (öðrum en vatni)

Tilraunadýr:

- tegund og stofn
- birgir og tiltekin starfsstöð birgis
- aldur fiska við upphaf prófunarinnar og ástand m.t.t. æxlunar/hrygningar
- upplýsingar um aðferð við aðlögun dýranna
- líkamsþyngd fiska við upphaf váhrifa (úr undirsýni úr fiskstofni)

Prófunaraðstæður:

- prófunaraðferð sem notuð er (tegund prófunar, hleðsluhlutfall, þéttleiki dýra o.s.frv.)
- aðferð við tilreiðslu á stofnlausnum og streymi
- nafnstyrkleikar í prófuninni, styrkleikar prófunarlausna mældir vikulega og greiningaraðferð sem er notuð, meðaltal mældra gilda og staðalfrávik í prófunarilátunum og staðfesting á því að mælingarnar eigi við styrkleika prófunarefnisins í eiginlegu lausninni
- eiginleikar þynningarvatnsins (þ.m.t. sýrustig, harka, basavirkni, hitastig, styrkur uppleysts súrefnis, styrkur klórleifa, heildarmagn lífræns kolefnis, svifagnir og niðurstöður úr öllum öðrum mælingum sem eru gerðar)
- gæði vatns í prófunarilátum, sýrustig, harka, hitastig og styrkur uppleysts súrefnis,
- ítarlegar upplýsingar um fôðrun (t.d. tegund fôðurs, uppruni, magn sem er gefið og tíðni og greining á viðeigandi aðskotaefnum ef hún liggur fyrir (t.d. fjölklóruð bifeyl, fjölhringa, arómatísk vetniskolefni og klórlífræn varnarefni)

Niðurstöður

- sannanir þess efnis að samanburðurinn uppfylli samþykktarviðmiðanir prófunarinnar
- gögn um dánartíðni við alla prófunarstyrkleika og í öllum samanburði
- tölfræðilegar greiningaraðferðir, sem eru notaðar, vinnsla gagna og rökstuðningur fyrir þeim aðferðum sem eru notaðar
- gögn um líffræðilegar athuganir á stórsæju formi og byggingu, þ.m.t. annars stigs kyneinkenni og vítellógenín
- niðurstöður úr greiningu á gögnum, helst sett fram í töflum og myndrænt
- öll tilvik þess að fiskur sýni óvenjulega svörun og öll sýnileg áhrif sem prófunariðefnið kallar fram.

LEIÐBEININGAR UM TÚLKUN OG SAMÞYKKI Á PRÓFUNARNIÐURSTÖÐUNUM

48. Í þessum lið eru nokkur atriði sem taka skal tillit til við túlkun á niðurstöðum úr prófunum fyrir þá mismunandi endapunkta sem mældir voru. Túlka skal niðurstöðurnar með gát ef prófunariðefnið virðist valda augljósum eiturhrifum eða hafa áhrif á almennt ástand tilraunadýrsins.
49. Þegar prófunarstyrkleikasviðið er ákveðið skal þess gætt að fara ekki yfir hámarksþolsstyrk til að unnt sé að túlka gögnin á marktækan hátt. Mikilvægt er að vera með a.m.k. einn meðhöndlunarhóp þar sem eru engin merki um eiturhrif. Meta skal merki um sjúkdóma og eiturhrif gaumgæfilega og gera grein fyrir þeim. Til dæmis er mögulegt að framleiðsla á vítellógeníni hjá kvendýrum geti einnig orðið fyrir áhrifum af almennum eiturhrifum og verkunarháttum eiturhrifa sem hafa ekki áhrif á innkirtla, t.d. eiturhrifum á lifur. Önnur meðhöndlunarstig sem eru ótrufluð af altækum eiturhrifum geta þó styrkt túlkun á áhrifum.
50. Hafa þarf nokkra þætti í huga við samþykkið á prófunarniðurstöðum. Sem viðmiðun ættu vítellógeníngildin í samanburðarhópum hænga og hrygna að vera greinileg og aðgreind með u.þ.b. þremur tugaprepum fyrir breiðkoll og sebradanna og u.þ.b. einu tugaprepi fyrir riskarpa. Dæmi um gildissvið sem koma fyrir í samanburðar- og meðhöndlunarhóp er að finna í fullgildingarskýrslum (1.–4. heimild). Há vítellógeníngildi í samanburðarhængum geta haft áhrif á svörunargetu greiningarinnar og getu hennar til að greina veika estrógenörva. Lág vítellógeníngildi í samanburðarhrygnum geta haft áhrif á svörunargetu greiningarinnar og getu hennar til að greina arómatasahömlun og estrógenblokka. Fullgildingarrannsóknirnar voru notaðar til að semja leiðbeiningarnar.
51. Ef rannsóknarstofa hefur ekki framkvæmt rannsóknina áður eða ef umtalsverðar breytingar (t.d. breytingar á fiskstofni eða birgi) hafa verið gerðar er ráðlegt að framkvæma rannsókn á tæknilegri hæfni. Mælt er með því að notuð sé iðefni sem hafa margs konar verkunarhætti eða áhrif á fjölda prófunarendapunktanna sem eru notaðir. Í raun er hver rannsóknarstofa hvött til þess að byggja upp sín eigin rannsóknarsögulegu samanburðargögn fyrir hænga og hrygnur og til að framkvæma prófun með jákvæðu viðmiðunariðefni m.t.t. estrógenvirkni (t.d. 17β-estráíól við 100 ng/l, eða þekktur, veikur örvi) sem leiðir til aukins vítellógeníns í hængum, jákvæðu viðmiðunariðefni m.t.t. arómatasahömlunar (t.d. fadrósól eða próklóras við 300 µg/l) sem leiðir til minna vítellógeníns í hrygnum og jákvæðu viðmiðunariðefni m.t.t. andrógenvirkni (t.d. 17β-trenbólón við 5 µg/l) sem leiðir til virkunar annars stigs kyneinkenna í breiðkolls- og riskarpahrygnum. Öll þessi gögn er hægt að bera saman við tiltæk gögn úr fullgildingarrannsóknum (1.–3. heimild) til að tryggja hæfni rannsóknarstofunnar.
52. Almennt séð ættu mælingar á vítellógeníni að teljast jákvæðar ef það er tölfræðilega marktæk aukning á vítellógeníni í hængum ($p < 0,05$) eða tölfræðilega marktæk minnkun í hrygnum ($p < 0,05$), a.m.k. við hæsta skammt sem er prófaður, samanborið við samanburðarhópinn og ef merki um almenn eiturhrif eru ekki fyrir hendi. Jákvæð niðurstaða er staðfest enn frekar með því að sýna fram á líffræðilega trúverðugt samband milli skammtsins og svörunarferilsins. Eins og áður hefur komið fram þarf minnkun vítellógeníns ekki að stafa að öllu leyfi frá innkirtlum; þó ætti almennt að túlka jákvæðar niðurstöður sem vísbendingu um innkirtlastarfsemi í lifi og ætti að jafnaði að hrinda af stað aðgerðum til að afla frekari skýringa.

HEIMILDIR

- 1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- 2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.
- 3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.
- 4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).

- 5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- 6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- 7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*;103 Suppl 7:173-8 Review.
- 8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 α -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- 9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- 10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*;67(1):121-30.
- 11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- 12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- 13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- 14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- 15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- 16) Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 β -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131: 531-539.
- 17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- 18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang JJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- 19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- 20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17 β -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) Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
 - 23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
 - 24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts”, not “traffic lights”, in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*;114 Suppl 1:106-14.
 - 25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - 26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
 - 27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18
 - 28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22
-

*I. viðbætur***Skammstafanir & skilgreiningar**

Íðefni: Efni eða blanda.

FS: Frávíksstuðull.

ELISA: ELISA-prófun

Hleðsluhlutfall: Blautvigt fiska miðað við rúmmál vatns.

Þéttleiki dýra: Fjöldi fiska miðað við rúmmál vatns.

Vítellógenín (VTG): Fosfólípóglýkóprótínforefni eggjarauðupróteíns sem er yfirleitt fyrir hendi í kynþroska kvendýrum af öllum eggþærum tegundum.

Undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaðxull (HPG): Undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaðxull.

Hámarksþolsstyrkur: Hámarksþolsstyrkur, sem nemur u.þ.b. 10% af LC₅₀.

Prófunariðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

2. viðbætur

Tilraunaskilyrði fyrir skimunargreiningu á innkirtlum fiska

1. Ráðlagðar tegundir	<i>Breiðkollur</i> (<i>Pimephales promelas</i>)	<i>Rískarpi</i> (<i>Oryzias latipes</i>)	<i>Sebradanni</i> (<i>Danio rerio</i>)
2. Tegund prófunar	Gegnumstreymi	Gegnumstreymi	Gegnumstreymi
3. Vatnshitastig	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Lýsing	Flúrperur (breitt róf)	Flúrperur (breitt róf)	Flúrperur (breitt róf)
5. Ljósstyrkur	10–20 µE/m ² /s, 540–1000 lux eða 50–100 ft-c (í rannsóknarstofu-umhverfinu)	10–20 µE/m ² /s, 540–1000 lux eða 50–100 ft-c (í rannsóknarstofu-umhverfinu)	10–20 µE/m ² /s, 540–1000 lux eða 50–100 ft-c (í rannsóknarstofu-umhverfinu)
6. Ljóslofa (umskipti með birtingu/rökkri eru valkvæð en þó ekki talin nauðsynleg)	Birta í 16 klst., myrkur í 8 klst.	Birta í 12–16 klst., myrkur í 12–8 klst.	Birta í 12–16 klst., myrkur í 12–8 klst.
7. Hleðsluhlutfall	< 5 g á hvern l	< 5 g á hvern l	< 5 g á hvern l
8. Stærð prófunarkerja	10 l (lágmark)	2 l (lágmark)	5 l (lágmark)
9. Rúmmál prófunarlausnar	8 l (lágmark)	1,5 l (lágmark)	4 l (lágmark)
10. Rúmmálsútskipti prófunarlausna	Að lágmarki 6 á dag	Að lágmarki 5 á dag	Að lágmarki 5 á dag
11. Aldur prófunarlífvera	Sjá 20. lið.	Sjá 20. lið.	Sjá 20. lið.
12. Áætluð blautvigt fullvaxins fisks	Hrygnur: 1,5 ± 20% Hængar: 2,5 ± 20%	Hrygnur: 0,35 ± 20% Hængar: 0,35 ± 20%	Hrygnur: 0,65 ± 20% Hængar: 0,4 ± 20%
13. Fjöldi fiska í hverju prófunarlíati	6 (2 hængar og 4 hrygnur)	10 (5 hængar og 5 hrygnur)	10 (5 hængar og 5 hrygnur)
14. Fjöldi meðhöndlana	= 3 (ásamt viðeigandi samanburðum)	= 3 (ásamt viðeigandi samanburðum)	= 3 (ásamt viðeigandi samanburðum)
15. Fjöldi ílata í hverri meðhöndlun	Að lágmarki 4	Að lágmarki 2	Að lágmarki 2
16. Fjöldi fiska á hvern prófunarstyrk	16 fullvaxnar hrygnur og 8 hængar (4 hrygnur og 2 hængar í hverju kerri samhliða prófunar)	10 fullvaxnar hrygnur og 10 hængar (5 hrygnur og 5 hængar í hverju kerri samhliða prófunar)	10 fullvaxnar hrygnur og 10 hængar (5 hrygnur og 5 hængar í hverju kerri samhliða prófunar)

17. Föðrunarfyrirkomulag	Lifandi eða frosnar saltvatnsrækjur, fullvaxnar eða krabballirfur, tvisvar eða þrisvar á dag (að vild), föður af almennum markaði eða sambland af ofangreindu.	Saltvatnsrækjur, fullvaxnar eða krabballirfur, tvisvar eða þrisvar á dag (að vild), föður af almennum markaði eða sambland af ofangreindu.	Saltvatnsrækjur, fullvaxnar eða krabballirfur, tvisvar eða þrisvar á dag (að vild), föður af almennum markaði eða sambland af ofangreindu.
18. Loftun	Engin nema styrkur uppleysts súrefnis falli undir 60% af metnun lofts	Engin nema styrkur uppleysts súrefnis falli undir 60% af metnun lofts	Engin nema styrkur uppleysts súrefnis falli undir 60% af metnun lofts
19. Þynningarvatn	Hreint yfirborðsvatn, brunnavatn eða endurgert vatn eða afklórað kranavatn	Hreint yfirborðsvatn, brunnavatn eða endurgert vatn eða afklórað kranavatn	Hreint yfirborðsvatn, brunnavatn eða endurgert vatn eða afklórað kranavatn
20. Tímabil á undan váhrifum.	Mælt er með 7 dögum	Mælt er með 7 dögum	Mælt er með 7 dögum
21. Tímalengd váhrifa af iðefni	21 dagur	21 dagur	21 dagur
22. Líffræðilegir endapunktur	lifun atferli annars stigs kyneinkenni vítellógenín	lifun atferli annars stigs kyneinkenni vítellógenín	lifun atferli vítellógenín
23. Til að prófun sé samþykkt	Uppleyst súrefni > 60% af metnun; meðalhiti 25 ± 2 °C; 90% lifun fiska í samanburðarhóp; mældir prófunarstyrkleikar innan 20% af meðaltali mæligilda á hvert meðhöndlunarstig.	Uppleyst súrefni > 60% af metnun; meðalhiti 24 ± 2 °C; 90% lifun fiska í samanburðarhópunum; mældir prófunarstyrkleikar innan 20% af meðaltali mæligilda á hvert meðhöndlunarstig.	Uppleyst súrefni > 60% af metnun; meðalhiti 26 ± 2 °C; 90% lifun fiska í samanburðarhópunum; mældir prófunarstyrkleikar innan 20% af meðaltali mæligilda á hvert meðhöndlunarstig.

3. viðbætur

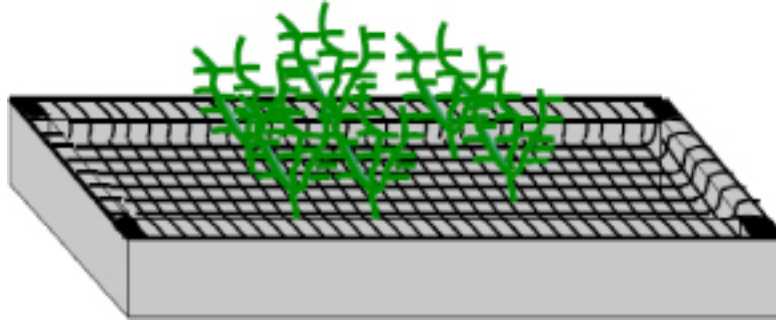
Nokkrir efnafræðilegir eiginleikar viðunandi þynningarvatns

Efnispáttur	Styrkur
Efnisagnir	< 20 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	< 2 mg/l
Ójónað ammoníak	< 1 µg/l
Klórleifar	< 10 µg/l
Heildarstyrkur fosfórlífrænna varnarefna	< 50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjólkloruðum bifénylum	< 50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	< 25 ng/l

4. viðbætur A

Hrygningarundirlag fyrir sebradanna

Hrygningarbakkki: tækjabakki úr gleri, t.d. $22 \times 15 \times 5,5$ cm ($l \times b \times d$), lokaður með vírgrind úr ryðfríu stáli sem hægt er að taka af (2 mm möskvar). Grindin skal ná yfir tækjabakkann og sitja neðan við brúnina.



Hrygningarundirlaginu skal komið fyrir á grindinni. Það ætti að mynda umhverfi fyrir fiskinn til að fara í. Til dæmis eru gervivatnaplöntur úr grænu plastefni hentugar (ath: hafa skal í huga hugsanlegt ásog prófunariðefnisins á plastefnið) Plastefnið skal skolað í nægu magni af volgu vatni nægilega lengi til að tryggja að engin iðefni losni út í prófunarvatnið. Þegar gler er notað skal tryggja að fiskarnir meiðist ekki né heldur sé þrengt að þeim við kröftugar hreyfingar.

Fjarlægð milli bakka og glerplatna skal vera a.m.k. 3 cm til að tryggja að hrygning verði ekki utan bakkans. Hrogn sem er hrygt á bakkann falla gegn um grindina og hægt er að taka þau 45–60 mínútum eftir að þau byrja að lýsast. Glæru hrognin loða ekki saman og auðvelt er að telja þau með því að nota lárétt ljós. Þegar 5 hrygnur eru í íláti teljast hrogn allt að 20 á dag sem fá, allt að 100 sem í meðallagi og yfir 100 sem mikill fjöldi. Fjarlægja skal hrygningarbakkann, safna hrognunum og setja hrygningarbakkann aftur í prófunarilátið, annað hvort eins seint að kvöldi og unnt er eða mjög snemma morguns. Ekki skal líða meira en ein klukkustund þangað til bakkinn er settur í aftur því annars getur hrygningarundirlagið orðið hvati til að virkja einstaklingsbundna pörun og hrygningu á óvenjulegum tímum. Ef skilyrðin eru þau að hrygningarbakkann þarf að setja síðar í skal það gert a.m.k. 9 klukkustundum eftir að kviknar á lýsingunni. Það seint að degi er hvati til hrygningar liðinn.

4. viðbætur B

Hrygningarundirlag fyrir breiðkoll

Tvær eða þrjár samsettar hrygningarplötur og -bakkar úr plasti/leir/gleri eða ryðfríu stáli eru sett í hvert prófunarker (t.d. 80 mm löng grá hálfhringlaga renna sem liggur á 130 mm löngum bakka með kanti) (sjá mynd). Komið hefur í ljós að rétt hertar (e. *seasoned*) plötur úr pólývínýlklóríði eða leir henta sem hrygningarundirlag (Thorpe *o.fl.*, 2007).

Mælt er með því að plöturnar séu hrufóttar til að bæta viðloðun. Einnig skal setja skilrúm um bakkann til að koma í veg fyrir að fiskarnir komist að hrognunum sem hafa fallið í gegn nema sýnt hafi verið fram á viðloðunarhæfni hrognanna í viðkomandi hrygningarundirlagi.



Undirstaðan er hönnuð til að halda öllum hrognum sem festast ekki við yfirborð plötunnar og myndu þar af leiðandi falla til botns í kerinu (eða hrognum sem hrygnt er beint á flatan plastbotninn). Skola skal allt hrygningarundirlag í a.m.k. 12 klukkustundir í þýnningarvatni fyrir notkun.

HEIMILDIR

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.

5. viðbætur A

Mat á annars stigs kyneinkennum í breiðkollu til að greina tiltekin íðefni sem hafa áhrif á innkirtlastarfsemi

Yfirlit

Útlitseiginleikar, sem geta verið mikilvægir í prófunum á innkirtlatruflandi efnum að því er varðar fullvaxna breiðkolla, eru m.a. bollitur (þ.e. ljós/dökkur), litmunstur (þ.e. eru lóðréttar rendur fyrir hendi eða ekki), líkamslögun, (þ.e. lögun á haus og frambolshluta, þrúttinn kviður) og sértæk annars stigs kyneinkenni (þ.e. fjöldi og stærð pörunarhnúta, stærð hnakkahnúðs og hrygningarpípu).

Pörunarhnútar eru staðsettir á haus (hnakkahnúð) kynþroska breiðkollshænga og raðast yfirleitt í tvíhliða samhverft mynstur (Jensen o.fl. 2001). Samanburðarhrygnur og ungvíði af báðum kynjum mynda enga hnúta (Jensen o.fl. 2001). Það geta verið allt að átta stakir hnútar umhverfis augun og á milli nasaopanna á hængunum. Flestu og stærstu hnútarnir liggja í tveimur samhliða línunum beint neðan við nasaopin og ofan við kjaftinn. Á mörgum fiskum er hópur af hnútum undir neðri kjálkanum; hnútar sem eru næstir kjaftinum eru yfirleitt stakt par en hnútar nær kviðnum geta verið allt að fjórir saman í hóp. Raunverulegur fjöldi hnúta fer sjaldnast yfir 30 (á bilinu 18–28) (Jensen o.fl. 2001). Hnútarnir, sem eru mest áberandi (í fjölda), eru stakir og tiltölulega kringlóttir að lögun og hæðin nokkurn veginn sú sama og raddiusinn. Flestir kynþroska hængar eru einnig með a.m.k. nokkra stækkaða og áberandi hnúta þannig að ekki er hægt að greina staka hnúta í þyrpingunni.

Sumar tegundir innkirtlatruflandi íðefna geta valdið óeðlilegum annars stigs kyneinkennum hjá hinu kyninu; t.d. geta andrógenviðtakaörvar, s.s. 17β-metýltestósterón eða 17β-trenbólon, valdið því að breiðkollshrygnur mynda pörunarhnúta (Smith 1974; Ankley o.fl. 2001; 2003) en estrógenviðtakaörvar geta fækkað pörunarhnútum á hængum eða minnkað þá (Miles-Richardson o.fl. 1999; Harries o.fl. 2000).

Hér á eftir er lýsing á eiginleikum pörunarhnúta á breiðkollum, byggð á verkferlum sem eru notaðir á rannsóknarstofu Umhverfisstofnunar Bandaríkjanna í Duluth, MN. Hægt er að skipta tilteknum vörum og/eða búnaði út fyrir sambærileg efni sem eru tiltæk.

Athuganir takast best ef notað er stækkunargler með ljósi eða krufningarsmásjá með ljósi og þrefaldri stækkun. Skoða skal fiskinn ofanfrá þannig að framhlutinn vísi fram (hausinn í áttina að þeim sem skoðar).

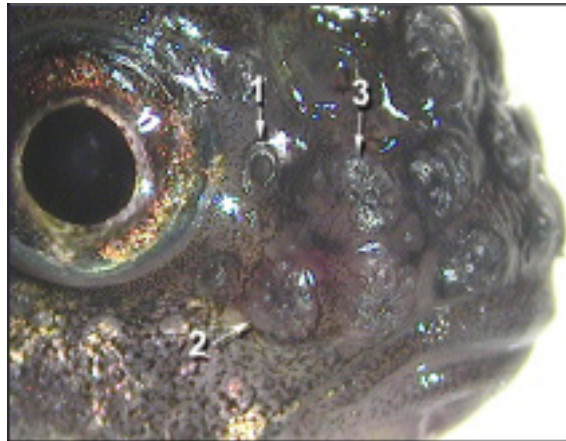
- Fiskurinn er settur í litla ræktunarskál (t.d. 100 mm í þvermál), hausinn vísar fram og kviðurinn snýr niður. Skerpa leitarans er stillt þannig að unnt sé að greina hnúta. Fiskinum er velt varlega og rólega til hliðanna til að greina hnútasvæði. Hnútar eru taldir og flokkaðir.
- Skoðunin er endurtekin með því að leggja fiskinn í ræktunarskál, kviðurinn látinn snúa upp og fremri hlutinn vísar fram.
- Ljúka skal skoðuninni á hverjum fiski á innan við tveimur mínútum.

Talning og flokkun á hnútum

Sex sérstök svæði hafa verið greind til að meta tilvist og þroskun hnúta á fullvöxnum breiðkollshængum. Sniðmát var þróað til að kortleggja staðsetningu og fjölda hnúta sem eru til staðar (sjá lok þessa viðbætis). Fjöldi hnúta er skráður og hægt er að flokka stærð þeirra megindlega á eftirfarandi hátt: 0-ekki fyrir hendi, 1-fyrir hendi, 2-stækkaðir og 3-áberandi, fyrir hverja lífveru (mynd 1).

Flokkur 0-engir hnúðar. Flokkur 1-fyrir hendi, greindir þannig að allir hnúðar séu með einn punkt þar sem hæðin er næstum því jöfn raddiusnum (þvermál). Flokkur 2-stækkaðir, greindir út frá vef sem líkist stjörnu í útliti, yfirleitt með stóran, hringhverfan grunnflöt með grópum eða skorum út frá miðjunni. Hæð hnúta er oft ójöfn en þeir geta af og til verið ávalir. Flokkur 3-áberandi, yfirleitt mjög stórir og ávalir og uppbyggingin ekki eins vel afmörkuð. Af og til renna þessir hnútar saman og mynda samhangandi massa eftir einu svæði eða fleiri svæðum (B, C og D, lýst hér á eftir). Litur og útlit eru svipuð og í flokki 2 en eru af og til tilviljanakennd. Almennt séð mun notkun á þessu flokkunarkerfi leiða til heildarhnútaastiga sem eru < 50 í venjulegum hæng í samanburðarhóp með hnútatöluna 18–20 (Jensen o. fl. 2001).

Mynd 1



Raunverulegur fjöldi hnúta á sumum fiskum getur verið meiri en í sniðmátsreitunum (viðbætur A) að því er varðar tiltekið flokkunarsvæði. Ef það gerist má bæta viðbótarflokkunartölum við í reitinn, hægra eða vinstra megin við hann. Þess vegna þarf sniðmátið ekki að vera samhverfa. Önnur tækni við að kortleggja hnúta, sem eru í þörum eða tengdir saman lóðrétt eftir láréttum fleti kjaftsins, gæti verið sú að tvímerkja tvö hnútaflokkunarstig í einn reit.

Kortlagningarsvæði:

A — Hnútar umhverfis augun. Kortlagt frá baki að kviði umhverfis augntóftina framanverða. Yfirleitt margir á fullorðnum samanburðarhængum, ekki fyrir hendi í samanburðarhrygnum, yfirleitt í þörum (einn við hvort auga) eða stakir á hrygnum sem hafa orðið fyrir váhrifum af andrógenum.

B — Hnútar á milli nasaopanna (skynrásaop, e. *sensory canal pores*). Yfirleitt í þörum á samanburðarhængum og meira áberandi þroskaðir (2-stækkaðir eða 3-áberandi). Ekki fyrir hendi á samanburðarhrygnum en þó kemur fyrir að þeir þroskast á hrygnum sem hafa orðið fyrir váhrifum af andrógenum.

C — Hnútar beint framan við nasaopin, samhliða kjaftinum. Yfirleitt stækkaðir eða áberandi á fullvöxnum samanburðarhængum. Fyrir hendi eða stækkaðir á minna þroskuðum hængum eða andrógenmeðhöndluðum hrygnum.

D — Hnútar samhliða meðfram kjaftinum. Yfirleitt metnir sem þroskaðir á samanburðarhængum. Ekki fyrir hendi á samanburðarhrygnum en finnast á hrygnum sem hafa orðið fyrir váhrifum frá andrógenum.

E — Hnútar á neðri kjálka, nálægt kjafti, yfirleitt litlir og yfirleitt í þörum. Breytilegir á samanburðarhængum eða meðhöndluðum hængum og meðhöndluðum hrygnum.

F — Hnútar kviðlægt við E. Yfirleitt litlir og í þörum. Fyrir hendi í samanburðarhængum og hrygnum sem hafa orðið fyrir váhrifum frá andrógenum.

HEIMILDIR

- 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.

Hnútasniðmát

Auðkenni _____

Dagsetning _____

Heildarstig _____

Flokkun í tölum

1-fyrir hendi

2-stækkaðir

3-áberandi

	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	

5. viðbætur B

Mat á annars stigs kyneinkennum í riskarpa til að greina tiltekin íðefni sem hafa áhrif á innkirtlastarfsemi

Hér fyrir neðan er lýsing á mælingum á totumyndun (*), sem eru annars stigs kyneinkenni hjá riskarpa (*Oryzias latipes*).

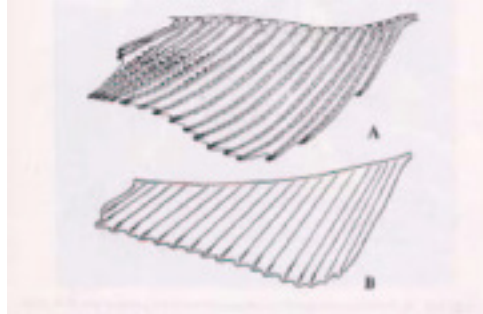
- (*) Totur myndast yfirleitt einungis hjá fullvöxnum hængum og finnast á geislum ugganna frá öðrum til sjöunda eða áttunda geisla, talið frá aftari enda raufarugga (mynd 1 og 2). Hins vegar vaxa totur sjaldan á fyrsta geisla uggans frá aftari enda raufarugga. Þessi staðlaða verklagsregla felur í sér mælingar á totum á fyrsta geisla uggans (í þessari verklagsreglu á númerið á geisla uggans við um röðina frá aftari enda raufaruggans).
- 1) Þegar lifrin hefur verið skorin úr (6. viðbætur) er fiskurinn settur í keilulaga tilraunaglas sem inniheldur u.þ.b. 10 ml af 10% formalíni með hlutlausum jafna (upp: haus, niður: sporður). Ef kynkirtlar eru festir í annarri lausn en 10% formalíni með hlutlausum jafna skal skera með rakvélarblaði þvert á fiskinn, milli fremri hluta raufaruggans og gotraufarinnar, og þess gætt að skadda ekki kynopið (e. *gonopore*) og kynkirtilinn sjálfan (mynd 3). Fiskurinn er settur þannig í að haushlutinn á fiskbolnum liggi í festiefnislausn til að varðveita kynkirtilinn og sporðhlutinn af fiskbolnum í 10% formalíni með hlutlausum jafna eins og lýst er hér að ofan.
 - 2) Eftir að fiskbolurinn hefur verið settur í 10% formalín með hlutlausum jafna skal taka um fremri hluta raufaruggans með tóng og halda ugganum útteygðum í u.þ.b. 30 sekúndur. Þegar gripið er um raufaruggann með tóng skal taka varlega um nokkra geisla uggans á fremri hlutanum og gæta þess að skaða ekki toturnar.
 - 3) Eftir að raufarugganum hefur verið haldið útteygðum í u.þ.b. 30 sekúndur skal setja fiskbolinn í 10% formalín með hlutlausum jafna við stofuhita þar til totumyndunin er mæld (framkvæma skal mælingar eftir festingu í a.m.k. 24 klst.).

Mæling

- 1) Eftir að fiskbolurinn hefur verið í festingu í 10% formalíni með hlutlausum jafna í a.m.k. 24 klst skal taka bolinn úr keilulaga tilraunaglasinu og þerra formalínið með síupappír (eða pappírþurrku).
- 2) Fiskurinn er lagður þannig að kviðurinn snúi upp. Síðan er raufarugginn klipptur varlega með litlum krufningarskærum (ákjósanlegast er að klippa raufaruggann af ásamt svolitlu magni af brjóski úr uggafestingunni (e. *pterygiophore*).
- 3) Tekið er um fremri hluta sundurskorna raufaruggans með tóng og hann settur á sýnisgler með nokkrum dropum af vatni. Síðan er þekjugler lagt yfir raufaruggann. Þegar tekið er um raufaruggann með tóng skal þess gætt að skráma ekki toturnar sem hafa myndast.
- 4) Fjöldi liðflata, sem totur hafa myndast á, er talinn með teljara undir lífgreiningarsmásjá (e. *biological microscope*) (lóðrétt smásjá eða umhverfð smásjá). Totumyndunin þekkist á því að litlar totur hafa myndast og eru sýnilegar á aftari brún liðflatarins. Skrá skal fjölda liðflata með totumyndun á hverjum geisla uggans á vinnuþlaggið (t.d. fyrsti geisli uggans: 0, annar geisli uggans: 10, þriðji geisli uggans: 12, o.s.frv.) og færa summu talnanna inn í excelskjalið fyrir hvern fisk. Ef nauðsyn krefur skal taka ljósmynd af raufarugganum og telja fjölda liðflata, sem totur hafa myndast á, á myndinni.
- 5) Eftir mælinguna skal setja raufaruggann í keilulaga tilraunaglassið sem lýst er í (1. heimild) og geyma.

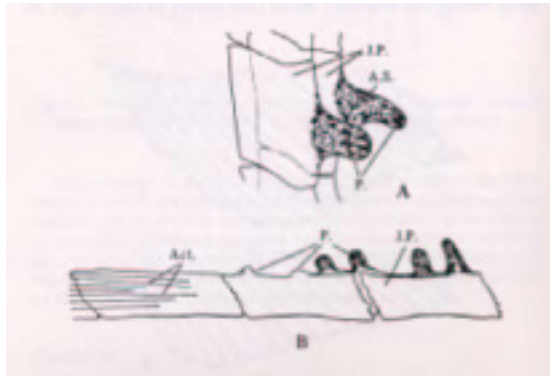
Mynd 1.

Skýringarmynd sem sýnir kynjamun á lögum og stærð raufaruggans. A, hængur; B, hrygna. 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.



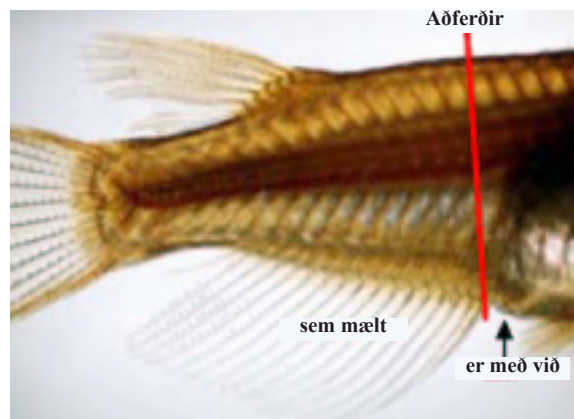
Mynd 2.A.

Totur á liðflötum geisla raufaruggans. J.P., liðplata; A.S., áslægt svæði; P., tota. B, ysti endi geisla uggans. Geislhárungar (e. Actinotrichia) (Act) eru á oddinum. 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.



Mynd 3.

Ljósmynd af fiskbol sem sýnir skurðsvæðið þegar kynkirtillinn er festur í annarri festivökvalausn en 10% formalín með hlutlausum jafna. Í því tilviki er eftirstandandi bolhluti skorinn af með rakvélarblaði milli fremri hluta raufaruggans og raufarinnar (rautt strik) og höfuðhluti bolsins settur í festivökvalausn fyrir kynkirtillinn og sporðhluti fiskbolsins settur í 10% formalín með hlutlausum jafna.



skurðsvæði raufaruggi endaþarmur

6. viðbætur

söfnun sýna til greiningar á vítellógeníni

Þess skal gætt að forðast víxlmengun milli vítellógenínsýna úr hængum og hrygnum.

Verkferli 1A: Breiðkollur, blóðsöfnun úr sporðbláæð/-slagæð

Eftir svæfingu er stirtlan skorin sundur að hluta til með skurðhnífi og blóði safnað úr sporðbláæð/-slagæð með heparínmeðhöndlaðri hárpípu fyrir blóðkornaskil. Eftir að blóðinu hefur verið safnað er blóðvökvinn einangraður í flýti með skilvindu í 3 mínútur við 15000 g (eða að öðrum kosti í 10 mín. við 15000 g við 4 °C). Ef þess er óskað er hægt að ákvarða hundradshlutfall blóðkornaskila eftir skiljun. Blóðvökvaskammturinn er síðan tekinn úr hárpípunni, sem er notuð við blóðkornaskilin, og geymd í skilvinduglasi með 0,13 einingum af aprótíníni (lati fyrir prótínkljúf) við – 80 °C þar til hægt er að ákvarða vítellógenínið. Magn blóðvökva, sem hægt er að safna (sem fer eftir kyni), háð stærð breiðkollsins, er yfirleitt á bilinu 5–60 µl úr hverjum fiski (Jensen *o.fl.* 2001).

Verkferli 1B: Breiðkollur, blóðsöfnun úr hjartanu

Þá er einnig hægt að safna blóði með hjartaástungu með heparínmeðhöndlaðri sprautunál (1000 einingar af heparíni á hvern ml). Blóðið er sett í Eppendorf-tilraunaglös (geymd á ís) og síðan skilið í skilvindu (5 mín., 7000 g, stofuhiti). Setja skal blóðvökvann í hrein Eppendorf-tilraunaglös (í deiliskömmtum ef rúmmál blóðvökvans gerir það kleift) og frysta þegar í stað við – 80 °C þangað til greining fer fram (Panter *o. fl.*, 1998).

Verkferli 2A: Japanskur riskarpi, lifur skorin úr riskarpa

Prófunarfiskur fjarlægður úr prófunarkeri

- 1) Fjarlægja skal prófunarfisk úr prófunarkeri með því að nota lítinn háf. Þess skal gætt að missa ekki prófunarfiskinn ofan í önnur prófunarker.
- 2) Að meginreglu til skal fjarlægja prófunarfiska í eftirfarandi röð: samanburður, samanburður með leysi (ef við á), minnsti styrkur, miðstyrkur, hæsti styrkur og jákvæður samanburður. Auk þess skal fjarlægja alla hænga úr einu prófunarkeri áður en hrygnurnar, sem eftir eru, eru fjarlægðar.
- 3) Kyn hvers prófunarfisks er sannreynt á grundvelli ytri, annars stigs kyneinkenna (t.d. lögur raufaruggans).
- 4) Prófunarfiskurinn er settur í flutningsílát og færður yfir á vinnustöðina í því skyni að skera lifrina úr. Gátað er að merkimiðar á prófunarkeri og flutningsílát sé réttir og til að staðfesta að fjöldi fiska, sem voru fjarlægðir úr prófunarkerinu, og fjöldi fiska, sem eftir er í prófunarkerinu, sé sá sem búist var við.
- 5) Ef ekki er unnt að greina kynið út frá ytra útliti fisksins skal taka alla fiskana úr prófunarkerinu. Í því tilviki skal greina kynið með því að skoða kynkirtil eða annars stigs kyneinkenni í þrívíddarsmásjá.

Lifrin skorin úr

- 1) Prófunarfiskurinn er fluttur með litlum háfi úr flutningsílátinu yfir í svæfingarlausnina.
- 2) Eftir að búið er að svæfa prófunarfiskinn er hann tekinn með töng (venjulegri töng) og færður yfir á síupappír (eða pappírspurrku). Þegar tekið er um prófunarfiskinn skal taka um báðar hliðar haussins með tönginni til að sporðurinn brotni ekki.
- 3) Vatnið er þerrað af yfirborði prófunarfisksins með síupappírnum (eða pappírspurrkunn).
- 4) Fiskurinn er lagður þannig að kviðurinn snúi upp. Síðan er klipptur lítill þverskurður mitt á milli háalssvæðisins kviðmegin og miðjunnar á kviðsvæðinu með krufningarskærum.
- 5) Krufningarskærunum er stungið inn í litla skurðinn og klippt á kviðinn frá punkti sporðmegin við

tálknmöttul (e. *branchial mantle*) eftir miðlínu kviðar að fremsta hluta gotraufar. Þess skal gætt að stinga krufningarskærunum ekki of djúpt inn til að forðast að skadda lifur og kynkirtla.

- 6) Eftirfarandi aðgerðir skulu fara fram undir þrívíddarsmásjá.
- 7) Prófunarfiskurinn er lagður á pappírþurrku þannig að kviðurinn snúi upp (eða á petrískál úr gleri eða sýnisgler).
- 8) Kviðarholsveggirnir eru glenntir út með finni töng og innri líffæri dregin út. Einnig má draga innri líffærin út með því að fjarlægja kviðarholsvegginn öðrum megin, ef þörf krefur.
- 9) Samtengdur hluti lifrar og gallblöðru er afhjúpaður með annarri finni töng. Síðan er tekið um gallrásina og gallblaðran skorin frá. Þess skal gætt að sprengja ekki gallblöðruna.
- 10) Tekið er um vélindað og magi og þarmar skornir frá lifrinni á sama hátt. Þess skal gætt að innihald meltingarvegarins leki ekki út. Aftasti hluti meltingarvegarins er skorinn frá gotraufinni og tekinn úr kviðarholinu.
- 11) Fitumassi og annar vefur er skorinn utan af lifrinni. Þess skal gætt að skráma ekki lifrina.
- 12) Tekið er um lifrarportæðasvæðið (e. *hepatic portal area*) með finni töng og lifrin fjarlægð úr kviðarholinu.
- 13) Lifrin er sett á sýnisglerið. Fína töngin er notuð til að fjarlægja alla umframfitu og utanaðkomandi vef af yfirborði lifrarinnar (t.d. holhimnu) ef þörf krefur.
- 14) Þyngd lifrar er mæld með 1,5 ml örtílaunaglasí (e. *microtube*) sem töru og á rafrænni fínvog. Gildið er skráð á vinnublaðið (aflestur: 0,1 mg). Staðfesta skal sanngreiningarupplýsingar á merkimiða örtílaunaglassins.
- 15) Lokinu á örtílaunaglasinu, sem inniheldur lifrina, er lokað. Geymið í kælistandi (eða ísstandi).
- 16) Þegar ein lifur hefur verið skorin úr skal hreinsa krufningaráhöldin eða skipta þeim út fyrir hrein áhöld.
- 17) Fjarlægja skal lifrina úr öllum fiskunum í flutningsílátinu eins og lýst er hér að framan.
- 18) Þegar lifrin hefur verið skorin úr öllum fiskunum í flutningsílátinu (þ.e. öllum hængum og hrygnum í prófunarkeri) skal setja öll lifrarsýnin í tilraunaglasastand með merkimiðum til auðkenningar og geyma hann í frysti. Þegar lifrar eru teknar til formeðhöndlunar skömmu eftir að þær eru skornar úr eru sýnin flutt yfir á næstu vinnustöð í kælistandi (eða ísstandi).

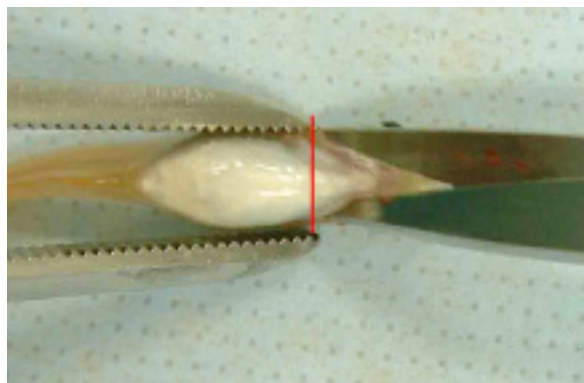
Eftir að lifrin hefur verið skorin úr má nota fiskskrokkinn til að meta annars stigs kyneinkenni.

Sýni

Geyma skal lifrarsýnin, sem tekin eru úr prófunarfiskinum, við ≤ -70 °C ef þau eru ekki notuð í formeðhöndlun skömmu eftir að þau eru skorin úr.

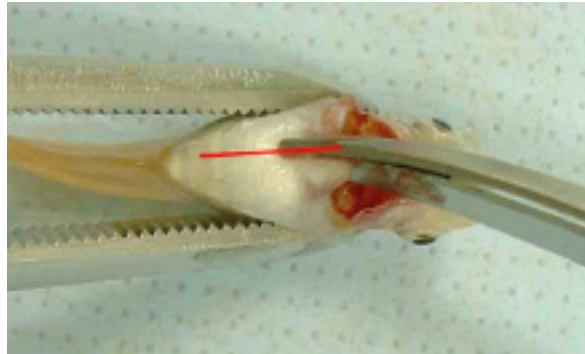
Mynd 1

Skurður er klipptur með skærum rétt framan við eyruggann.



Mynd 2

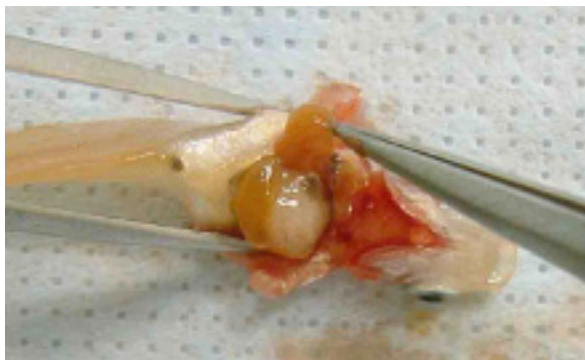
Klippt er í miðlínu kviðar með skærum að punkti sem er u.þ.b. 2 mm framan við gotraufina.

*Mynd 3*

Kviðveggirnir eru glenntir sundur með töng til að afhjúpa lifrina og önnur innri líffæri. (Einnig má festa kviðveggina niður til hliðar).

*Mynd 4*

Lifrin er klippt frá með töng og dregin út með henni.



Mynd 5

Garnirnar eru dregnar varlega úr með töng.

*Mynd 6*

Báðir endar garnanna og hugsanlegir áfastir hlutar garnahengisins eru klipptir frá með skærum.

*Mynd 7 (kvendýr)*

Verkferlið er hið sama fyrir hrygnuna.



Mynd 8

Verkferli lokið.**Verkferli 2 B: Japanskur rískarpi (*Oryzias latipes*), formeðhöndlun á lifur vegna greiningar á vítellógeníni**

Flaskan með jafningsjafnalausninni er tekin úr ELISA-settinu og kæld með ískurli (hitastig lausnarinnar: ≤ 4 °C). Ef notuð er jafningsjafnalausn úr EnBio ELISA-kerfinu skal lausnin þídd við stofuhita og flaskan síðan kæld með ískurli.

Rúmmál jafningsjafnalausnarinnar er reiknað út á grundvelli þyngdar hennar (50 μ l af jafningsjafnalausn er bætt við á hvert mg af þyngd lifrarinnar í jafningnum). Ef þyngd lifrarinnar er t.d. 4,5 mg er rúmmál jafningsjafnalausnarinnar fyrir lifrina 225 μ l. Gera skal skrá yfir rúmmál jafningsjafnalausna fyrir allar lifrar.

Lifrin undirbúin fyrir formeðhöndlun

- 1) Taka skal 1,5 ml örtilraunaglasíð með lifrinni úr frystinum rétt fyrir formeðhöndlunina.
- 2) Lifur úr hægum skal formeðhöndluð áður en lifur úr hrygnum er formeðhöndluð til að koma í veg fyrir vítellógenínmengun. Auk þess skal formeðhöndlun á prófunarhópum fara fram í eftirfarandi röð: samanburður, samanburður með leysi (ef við á), minnsti styrkur, miðstyrkur, hæsti styrkur og jákvæður samanburður.
- 3) Fjöldi 1,5 ml örtilraunaglasa, sem innihalda lifrarsýni og tekin eru úr frysti á tilteknu tímabili, skal ekki fara yfir þann fjölda sem hægt er að skilja í skilvindu á viðkomandi tímapunkti.
- 4) Raða skal 1,5 ml örtilraunaglösunum með lifrarsýnunum í ísstandinn í röð eftir númerum á sýnum (óþarft er að þíða lifrina).

Framkvæmd formeðhöndlunar

1. Ísetning jafningsjafnalausnarinnar
 - 1) Litið er í skrána til að finna hvert rúmmál jafningsjafnalausnar tiltekins lifrarsýnis á að vera og örpípettan stillt (rúmmálssvið: 100–1000 μ l) fyrir viðeigandi rúmmál. Hreinn oddur er festur á örpípettuna.
 - 2) Jafnalausnin fyrir jafninginn er tekinn úr prófefnaflöskunni og bætt í 1,5 ml örtilraunaglas sem inniheldur lifrina.
 - 3) Jafnalausninni er bætt í öll 1,5 ml örtilraunaglös, sem innihalda lifur, samkvæmt verkferlinu sem lýst er hér að ofan. Ekki er þörf á að skipta oddinum á örpípettunni út fyrir nýjan. Ef oddurinn er mengaður eða ef grunur leikur á um að hann sé mengaður skal þó skipt um hann.

2. Lifrín jöfnuð
 - 1) Nýr stautur er festur á jafnara (e. *homogeniser*) fyrir örtilraunaglös.
 - 2) Stauturinn er settur í 1,5 ml örtilraunaglasíð. Jafnarannum fyrir örtilraunaglasíð er haldið þannig að lifrín pressist milli yfirborðsins á stautnum og innri veggjar 5 ml örtilraunaglassins.
 - 3) Jafnarinn fyrir örtilraunaglasíð er látinn ganga í 10–20 sekúndur. Meðan á aðgerðinni stendur er 1,5 ml örtilraunaglasíð kælt með ískurli.
 - 4) Stautnum er lyft upp úr 1,5 ml örtilraunaglasinu og látinn bíða í u.þ.b. 10 sekúndur. Síðan er ástand sviflausnarinnar kannað sjónrænt.
 - 5) Ef lifrifarbitar sjást í sviflausninni skal endurtaka aðgerð 3) og 4) til að tilreiða fullnægjandi lifrarjafning.
 - 6) Lifrarjafningurinn í sviflausninni er kældur í ísstandinum þar til hann er skilinn í skilvindu.
 - 7) Skipt er um staut fyrir hvern jafning.
 - 8) Jafna skal allar lifrar með jafningsjafnalausn samkvæmt verkferlinu sem lýst er hér að ofan.
3. Lifrarjafningurinn í sviflausinni skilinn í skilvindu
 - 1) Staðfesta skal að hitastigið á skilvindukæliklefunum sé við ≤ 5 °C.
 - 2) Setja skal 1,5 ml örtilraunaglasíð, sem inniheldur lifrarjafninginn í sviflausninni, í kælskilvindu (aðlaga jafnvægið ef þörf krefur).
 - 3) Lifrarjafningurinn í sviflausninni er skilinn í skilvindu við 13000 g í 10 mínútur við ≤ 5 °C. Ef lögin, sem fljóta ofan á, eru nægilega vel aðskilin er þó hægt að stilla kraft skilvindunnar og tíma eftir þörfum.
 - 4) Eftir skiljun skal kanna hvort lögin, sem fljóta ofan á, eru nægilega vel aðskilin (yfirborð: lípið, millilag: flot, botnlag: lifrarvefur). Ef aðskilnaðurinn er ekki fullnægjandi skal skilja sviflausnina aftur við sömu skilyrði.
 - 5) Taka skal öll sýnin úr kælskilvindunni og raða þeim í ísstandinn í röð eftir númerunum á þeim. Þess skal gætt að þyrta ekki aðskildum lögum upp aftur eftir skiljun.
4. Söfnun á flotinu
 - 1) Fjögur 0,5 ml örtilraunaglös til að geyma flotið í eru sett í tilraunaglasastandinn.
 - 2) Safnað er 30 μ l af hverju floti (aðskilið sem millilagið) með örpípettu og það sett í eitt 0,5 ml örtilraunaglas. Þess skal gætt að taka hvorki af lípiðinu á yfirborðinu né lifrarvefnum í botnlaginu.
 - 3) Flotinu er safnað og það sett í næstu tvö 0,5 ml örtilraunaglös á sama hátt og lýst er hér að framan.
 - 4) Afgangnum af flotinu er safnað með örpípettunni (ef mögulegt er: ≥ 100 μ l). Síðan er flotið sett í 0,5 ml örtilraunaglasíð sem eftir er. Þess skal gætt að taka hvorki af lípiðinu á yfirborðinu né lifrarvefnum í botnlaginu.
 - 5) Lokinu á 0,5 ml örtilraunaglasinu er lokað og rúmmál flotsins skrifað á merkimiðann. Síðan eru örtilraunaglösín kæld samstundis í ísstandinum.
 - 6) Skipt er um odd á örpípettunni fyrir hvert flot. Ef mikið magn lípiðs festist við oddinn skal tafarlaust setja nýjan odd til að forðast að lifrarkjarninn mengist af fitu.

- 7) Öllu flotinu, sem var skilið í skilvindu, er skipt í fjögur 0,5 ml örtíraunaglös samkvæmt verkferlinu sem lýst er hér að framan.
- 8) Eftir að flotinu hefur verið skipt í 0,5 ml örtíraunaglösin skal setja þau öll í tilraunaglasastandinn með merkimiðanum og frysta þau síðan tafarlaust í frystinum. Ef styrkur vítellógeníns er mældur tafarlaust eftir formeðhöndlun skal halda einu 0,5 ml örtíraunaglas (sem inniheldur 30 μ l af floti) köldu í tilraunaglasastandinum og færa það yfir á vinnustöðina þar sem ELISA-prófunin er framkvæmd. Í slíku tilvikum skal setja örtíraunaglösin, sem eftir eru, í tilraunaglasastandinn og frysta þau í frystinum.
- 9) Eftir að flotinu hefur verið safnað skal leifunum fleygt eftir því sem við á.

Geymsla á sýninu

Geyma skal 0,5 ml örtíraunaglösin með flotinu af lifrarjafningnum við ≤ -70 °C þar til þau eru notuð í ELISA-prófunina.

Verkferli 3A: Sebradanni, blóðsöfnun úr sporðbláæð/-slagæð

Strax eftir svæfingu er stirtlan skorin þvert í sundur og blóðið fjarlægt úr sporðslagæð/-bláæð með heparín-meðhöndlaðri hárpípu, notaðri við blóðkornaskil. Magn blóðs er á bilinu 5–15 μ l, háð stærð fíksins. Sama rúmmáli af aprótíninjalnausn (6 μ g/ml í fosfatstilltri saltlausn) er bætt við hárpípuna, sem er notuð við blóðkornaskil, og blóðvökvinn aðskilinn frá blóðinu með skiljun (5 mínútur við 600 g). Blóðvökva er safnað í tilraunaglösin og geymdur við -20 °C þangað til hann er greindur m.t.t. vítellógeníns eða annarra prótína sem eru til athugunar.

Verkferli 3B: Sebradanni, blóðsöfnun með hjartaástungu

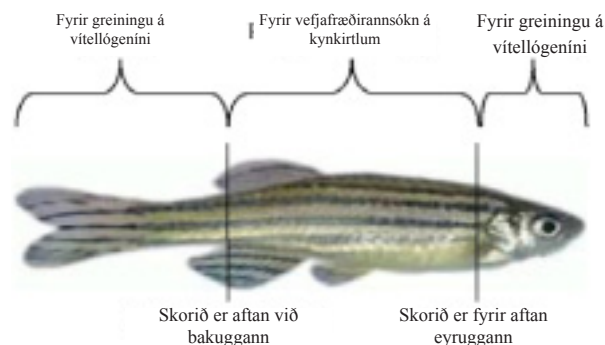
Til að komast hjá storknun blóðs og prótíniðurbroti skal safna sýnunum í jafnalausn með fosfatstilltri saltlausn sem inniheldur heparín (1000 einingar/ml) og prótínkljúfatann aprótínin (2 TIU/ml). Mælt er með heparínammóníumsalti og frostþurrkuðu aprótíni sem innihaldsefni í jafnalausnina. Mælt er með sprautu (1 ml) með áfastri, fínni nál (t.d. Braun Omnikan-F) til blóðsýnatöku. Sprautan skal forfyllt með jafnalausn (u.þ.b. μ l) til að skola alveg út hið litla blóðmagn úr hverjum fiski. Blóðsýnin eru tekin með hjartaástungu. Fyrst skal svæfa fiskinn með MS-222 (100 mg/l). Með réttari svæfingu er notandanum kleift að greina hjartslátt sebradannans. Meðan stungið er í hjartað skal vera með vægan þrýsting á sprautustimplinum. Magn blóðs, sem hægt er að safna, er á bilinu 20–40 míkrólítrar. Eftir hjartaástunguna skal setja blóð-/jafnalausnarblönduna í tilraunaglasíð. Blóðvökvinn er aðskilinn frá blóðinu með skilju (20 mínútur, 5000 g) og skal geymdur við -80 °C þangað til þörf er á honum til greiningar.

Verkferli 3C: Stöðluð verklagsregla: Sebradanni, haus & sporður jafnaðir

- 1) Fiskurinn er svæfður og aflífaður í samræmi við lýsingu á prófun.
- 2) Haus og sporður eru skornir af fiskinum í samræmi við mynd 1.

Mikilvægt: Öll krufningaráhöld og skurðarbrettið skal skola og hreinsa vandlega (t.d. með 96% etanóli) áður en hver fiskur er meðhöndlaður til að koma í veg fyrir „vítellógenínmengun“ frá hrygnum eða meðhöndluðum hængum yfir í ómeðhöndlaða hænga.

Mynd 1



- 3) Samanlögð þyngd hauss og sporðs af hverjum fiski er mæld að næsta mg.
- 4) Eftir að hlutarnir hafa verið vagnir eru þeir settir í viðeigandi tilraunaglös (t.d. 1,5 ml eppendorf) og frystir við $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ þangað til þeir eru jafnaðir eða þeir eru strax jafnaðir á ís með tveimur plaststautum. (Hægt er að nota aðrar aðferðir ef þær eru gerðar á ís og útkoman er einsleitur massi). Mikilvægt: Númera skal tilraunaglösin rétt þannig að hægt sé að tengja haus og sporð hvers fisks við bolhluta hans sem eru notaðir í vefjafræðirannsókn á kynkirtlum.
- 5) Þegar einsleitur massi hefur náðst er bætt við ískaldri jafningsjafnalausn (*) sem nemur fjórfaldri þyngd vefjarins. Unnið er áfram með stautinn þar til blandan er jöfnuð. Mikilvægt athugasemd: Nota skal nýjan staut fyrir hvern fisk.
- 6) Sýnin eru geymd á ís fram að skiljun við $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ við $50000 \times \text{g}$ í 30 mínútur.
- 7) Notuð er pípetta til að setja 20 μl skammt af floti í a.m.k. tvö tilraunaglös með því að dýfa oddinum á pípettunni niður fyrir fitulagið á yfirborðinu og sjúga flotið varlega upp án fituarða eða kögglabrota.
- 8) Tilraunaglösin eru geymd við $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ uns þau eru notuð.

(*) **Jafnalausn fyrir jafning**

- (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% blanda prótínkljúfalata (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl blanda prótínkljúfalata.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) t.d. frá Bie & Berntsen, Danmörku.
- Blanda prótínkljúfalata: Frá Sigma (fyrir spendýravefi), vara nr. P 8340.
- *Athugasemd:* Nota skal jafnalausnina fyrir jafninginn sama dag og hún er tilreidd. Hún er höfð á ís meðan á notkun stendur.

*7. viðbætur***Vítellógenínstyrkt sýni og viðmiðunarstaðall milli prófana**

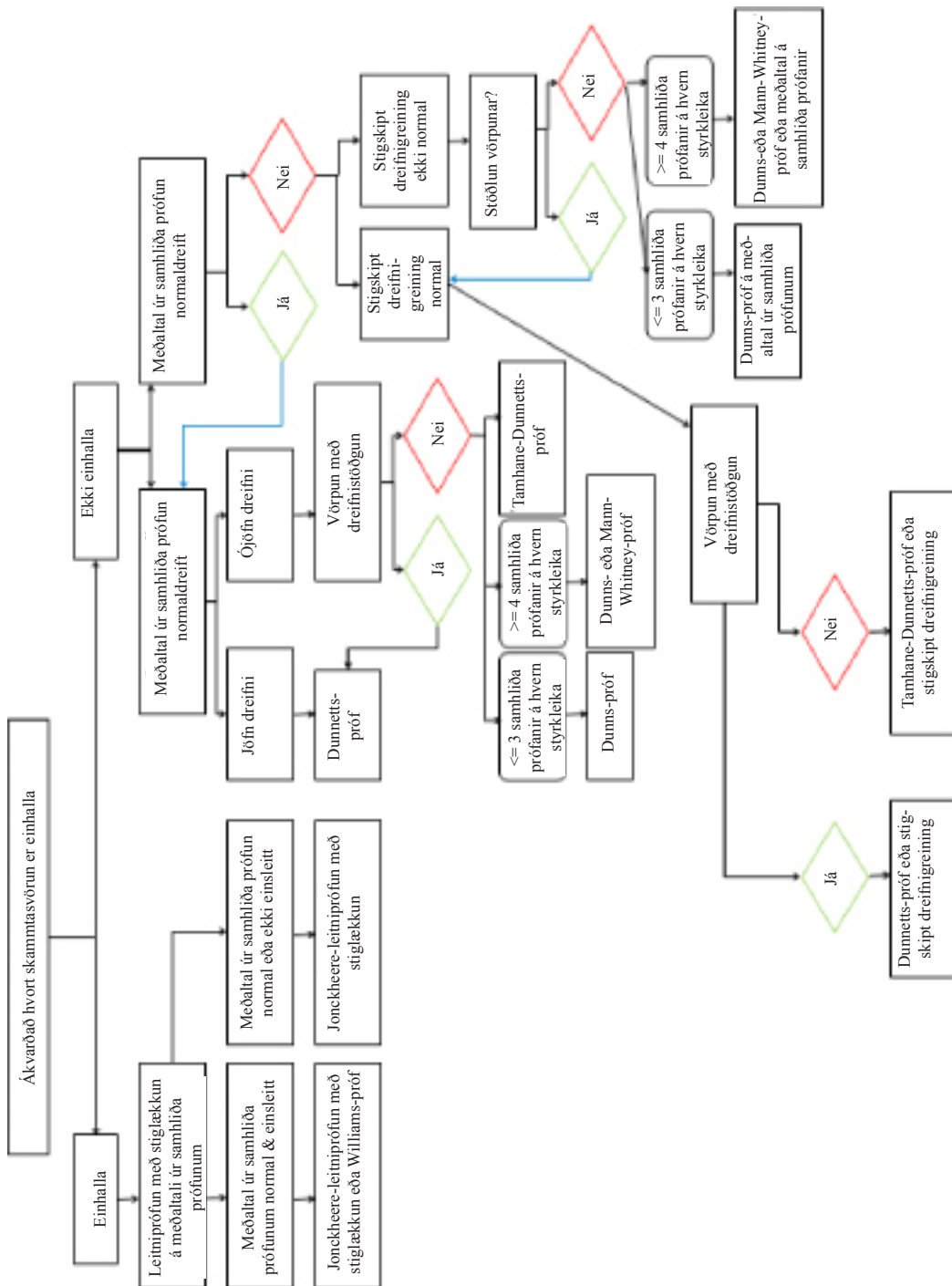
Hvern þann dag sem vítellógeníngreiningar eru framkvæmdar skal greina styrkingarsýni sem er gert með því að nota viðmiðunarstaðal milli prófana. Vítellógenínið, sem er notað til að gera viðmiðunarstaðal milli prófana, skal koma úr annarri framleiðslulotu en notuð er til að tilreiða kvörðunarstaðla fyrir rannsóknina sem gerð er.

Styrkingarsýnið skal gert með því að bæta þekktu magni af prófunarviðmiðunarstaðli við sýni af blóðvökva úr samanburðarhængum. Sýnið er styrkt til að það nái vítellógenínstyrk á bilinu 10–100-földum þeim styrk vítellógeníns sem búist er við í hængum í samanburðinum. Styrkt sýni af blóðvökva úr samanburðarhængum getur verið úr einstökum fiski eða samsett úr nokkrum fiskum.

Undirsýni úr óstyrktum blóðvökva úr samanburðarhængum er greint í a.m.k. tveimur eins sýnum í bakka. Styrkta sýnið er einnig greint í a.m.k. tveimur eins sýnum í bakka. Meðaltali vítellógenínmagns í tveimur óstyrktum blóðvökasýnum úr viðmiðunarhængum er bætt við útreiknað magn vítellógeníns sem bætt er við sýnin til að ákvarða þann styrk sem búist er við. Gera verður grein fyrir hlutfallinu milli styrks sem búist er við og mælds styrks ásamt niðurstöðum úr hverri röð greininga sem eru framkvæmdar þann dag.

8. viðbætur

Flæðirit til hjálpar við ákvörðun á tölfraeðilegri greiningu



C.38. GREINING Á MYNDBREYTINGU HJÁ FROSKDÝRUM**INNGANGUR**

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 231 um prófanir (2009). Þörfin til að þróa og fullgilda greiningu sem getur greint íðefni sem hafa áhrif á skjaldkirtilskerfi hryggdýrategunda sprettur af áhyggjum af því að magn íðefna í umhverfinu geti valdið skaðlegum áhrifum, bæði á menn og villtar lífverur. Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að forgangsáðgerð árið 1998 til að endurskoða fyrirliggjandi viðmiðunarreglur um prófanir og þróa nýjar viðmiðunarreglur um skimun og prófun á efnum sem eru hugsanlega innkirtlatruflandi. Einn þátturinn í aðgerðinni var að þróa viðmiðunarreglur um skimun fyrir íðefnum sem hafa áhrif á skjaldkirtilskerfi hryggdýra. Gerðar voru tillögur um bætta 28 daga rannsókn á eiturrifum hjá nagdýrum við endurtekna skammta um munn (*Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents*) (kafla B.7 í þessum viðauka) og greiningu á myndbreytingu hjá froskdýrum (AMA). Bætta prófunaraðferðin B.7 var fullgilt og endurskoðuð prófunaraðferð hefur verið gefin út. Greining á myndbreytingu hjá froskdýrum fór í gegnum umfangsmikið fullgildingarferli, þ.m.t. einseturs- og fjölsetrarannsóknir, þar sem sýnt var fram á vægi og áreiðanleika rannsóknarinnar (1.–2. heimild). Síðan var fullgilding greiningarinnar lögð fram til jafningjarýni hjá nefnd óháðra sérfræðinga (3. heimild). Þessi prófunaraðferð er afkastur þeirrar reynslu sem aflað var við fullgildingarrannsóknir til að greina skjaldkirtilsvirk íðefni og vinnu sem fram fór í öðrum aðildarlöndum Efnahags- og framfarastofnunarinnar.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

2. Greining á myndbreytingu hjá froskdýrum er skimunargreining sem ætlað er að sanngreina, á reynslugrundvelli, íðefni sem geta truflað eðlilega starfsemi í undirstúku-, heiladinguls- og skjaldkirtilsöxli. Greining á myndbreytingu hjá froskdýrum er almennt líkan fyrir hryggdýr að því marki að hún byggist á formgerðum og starfsemi undirstúku-, heiladinguls- og skjaldkirtilsöxuls sem hafa ekki breyst. Þetta er mikilvæg greining sökum þess að myndbreyting hjá froskdýrum sýnir vel rannsakað skjaldkirtilsháð ferli sem bregst við íðefnum sem eru virk innan undirstúku-, heiladinguls- og skjaldkirtilsöxuls og er eina greiningin sem til er sem greinir skjaldkirtilsvirkni í dýri sem gengur í gegn um formfræðilega þroskun.
3. Almenn tilhögun tilraunar felur í sér að halakörtur á 51. stigi, af tegundinni *Xenopus laevis*, eru látnar verða fyrir váhrifum af a.m.k. þremur mismunandi styrkleikum prófunariðefnis og samanburðarprófun með þynningarvatni í 21 dag. Fyrir hverja prófunarmeðhöndlun eru fjórar samhliða prófanir. Þéttleiki lirfa í öllum meðhöndlunarhópum við upphaf prófunar er 20 halakörtur í prófunartanki. Endapunktur athugunar eru lengd afturfóta, lengd frá snoppu að þarfagangi, þroskunarstig, blautvigt, vefjafræði skjaldkirtils og daglegar athuganir á afföllum.

LÝSING Á AÐFERÐINNI**Prófunartegund**

4. *Xenopus laevis* er almennt ræktuð á rannsóknarstofum á heimsvísu og er auðfáanleg frá sölubirgjum. Auðvelt er að framkalla æxlun hjá þessari tegund allt árið með því að sprauta dýrin með æðabelgskynhormónavaka manna og lirfurnar sem verða til er hægt að ala kerfisbundið í miklu magni að völdum þroskunarstigum til að gera kleift að nota aðferðarlýsingar prófana á tilteknum stigum. Ákjósanlegt er að lirfurnar, sem eru notaðar í greiningunni, komi frá fullvöxnum dýrum innan rannsóknarstofunnar. Að öðrum kosti er heimilt, þó að þetta sé ekki ákjósanlega aðferðin, að senda egg eða fösturvísa á rannsóknarstofuna, sem annast prófunina, og láta þau aðlagast; sendingar af lirfustigum til notkunar í prófunina eru ekki ásættanlegar.

Búnaður og birgðir

5. Þörf er á eftirfarandi búnaði og birgðum til að framkvæma þessa greiningu:
 - a) váhrifakerfi (sjá lýsingu hér að neðan),
 - b) ker úr gleri eða ryðfríu stáli (sjá lýsingu hér að neðan),
 - c) undaneldistankar,
 - d) hitastýringartæki (t.d. hitarar eða kælar (stillanlegir að $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)),

- e) hitamælir,
- f) tvísæismásjá til krufningar,
- g) stafræn myndavél með a.m.k. 4 megapixla upplausn og míkrostillingu (e. *micro function*),
- h) hugbúnaður til að flytja myndir á stafrænt form,
- i) petrískál (t.d. 100 × 15 mm) eða gagnsætt plasthólf af svipaðri stærð,
- j) finvog sem getur mælt með þremur aukastöfum (mg),
- k) mælir fyrir uppleyst súrefni,
- l) sýrustigsmælir,
- m) ljósstyrksmælir sem getur mælt í lúx-einingum,
- n) ýmiss konar glervara og áhöld fyrir rannsóknarstofu,
- o) stillanlegar pípettur (10 til 5000 µl) eða blandaðar pípettur af samsvarandi stærðum,
- p) prófunariðefni í nægu magni til að framkvæma rannsóknina, helst úr einni framleiðslulotu,
- q) tækjabúnaður til efnagreininga sem hentar iðefninu sem er til prófunar eða samningur við greiningaþjónustu.

Efnafræðileg prófunarhæfni

6. Greining á myndbreytingu hjá froskdýrum byggist á rannsóknaráætlun vegna váhrifa í vatni þar sem prófunariðefnið er sett í prófunarhólfin með gegnumstreymiskerfi. Gegnumstreymisaðferðir setja þó hömlur á það á hvaða tegundum iðefna er hægt að gera prófanir, sem ákvarðast af eðlisefnafræðilegum eiginleikum iðefnisins. Af þeim sökum skal útvega grunnupplýsingar um iðefnið, sem skipta máli við að ákvarða prófunarhæfni þess, áður en rannsóknaráætlunin er notuð og fletta skal upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir í vatni á eiturrifum iðefna og blandna, sem erfið er að gera prófanir á (*OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*) (4. heimild). Eiginleikar sem benda til þess að erfið geti reynst að gera prófanir á iðefninu í lagarkerfum eru m.a.: háir deilistuðlar oktanóls/vatns ($\log K_{ow}$), mikil rokgrini, viðkvæmni fyrir vatnsrofi og viðkvæmni fyrir ljósrofi við birtuskilyrði í umhverfi rannsóknarstofunnar. Aðrir þættir geta einnig skipt máli við að ákvarða prófunarhæfni og skulu ákvarðaðir í hverju tilviki fyrir sig. Ef ekki er hægt að prófa iðefni á fullnægjandi hátt með gegnumstreymisprófunarkerfi er hægt að nota kyrrstöðukerfi með endurnýjun. Ef hvorugt kerfið getur tekið við prófunariðefninu er sjálfgefið að iðefnið skuli ekki prófað með því að nota þessa rannsóknaráætlun.

Váhrifakerfi

7. Gegnumstreymisþýningarkerfi er ákjósanlegast, ef unnt er, fremur en kyrrstöðukerfi með endurnýjun. Ef eðlisfræðilegir og/eða efnafræðilegir eiginleikar einhverra prófunariðefna henta ekki gegnumstreymisþýningarkerfi er hægt að nota annað váhrifakerfi (t.d. kyrrstaða með endurnýjun). Þeir ihlutir kerfisins sem komast í snertingu við vatn skulu vera úr gleri, ryðfríu stáli og/eða pólýtetraflúoretýleni. Þó er viðeigandi plast nothæft ef það stofnar rannsókninni ekki í hættu. Váhrifatankar skulu vera ker úr gleri eða ryðfríu stáli, búnir vatnsgeymum þannig að rúmmál tanksins verði á bilinu u.þ.b. 4,0–10,0 l og vatnsdýpt að lágmarki 10–15 cm. Kerfið skal vera fært um að bera alla váhrifastyrkleika og samanburð, með fjórar samhliða prófanir á hverja meðhöndlun. Streymi í hvern tank skal vera stöðugt, bæði að því er varðar að viðhalda líffræðilegu ástandi og iðefnaváhrif (t.d. 25 ml/mín.). Raða skal meðhöndlunartönkum af handahófi í váhrifakerfið til að draga úr hugsanlegum áhrifum af völdum staðsetningar, þ.m.t. lítills háttar frávik í hitastigi, ljósstyrk o.s.frv. Nota skal flúrlýsingu til að fá ljóslotu með 12 klst. birtu: 12. klst. myrkri við styrk á bilinu 600 til 2000 lúx (lúmen/m²) við yfirborð vatnsins. Vatnshitastigi skal haldið við 22° ± 1 °C, pH-gildi haldið á bilinu 6,5 til 8,5 og styrk uppleysts súrefnis > 3,5 mg/l (> 40% af metnun lofts) í hverjum prófunartanki. Að lágmarki skal mæla vatnshitastig, sýrustig og uppleyst súrefni vikulega; helst skal mæla hitastig stöðugt í a.m.k. einu prófunarlíati. Í 1. viðbæti eru tilgreind þau tilraunaskilyrði sem rannsóknaráætlunin skal framkvæmd við. Sjá „ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians“ (5. heimild) og almennar eiturefnafræðilegar prófanir í vatni fyrir frekari upplýsingar um uppsetningu á gegnumstreymisváhrifakerfum og/eða kyrrstöðukerfum með endurnýjun.

Vatnsgæði

8. Hægt er að nota allt vatn sem er tiltækt á staðnum (t.d. lindarvatn eða viðarkolasíað kranavatn) og gerir halakörtum af tegundinni *X. laevis* kleift að vaxa og þroskast eðlilega. Sökum þess að gæði staðarvatns geta verið mjög breytileg milli svæða skal takast á hendur greiningu á vatnsgæðum, einkum ef rannsóknarsöguleg gögn um notkun vatnsins til að ala *Xenopus* eru ekki tiltæk. Gefa skal sérstakan gaum að því að vatnið sé laust við kopar, klór og klóramín sem öll eru eitruð fyrir froska og halakörtur. Enn fremur er mælt með því að vatnið sé greint m.t.t. bakgrunnsgilda flúoríðs, perklórats og klórats (aukaafurðir frá sóttþreinsun drykkjarvatns) þar eð allar þessar mínusjónir eru undirstöðuefni fyrir joðflutning skjaldkirtilsins og hækkuð gildi hversrar mínusjónar fyrir sig getur truflað niðurstöðu rannsóknarinnar. Greining skal framkvæmd áður en prófunin hefst og prófunarvatnið skal alla jafna laust við þessar mínusjónir.

Joðiðstyrkur í prófunarvatni

9. Til þess að skjaldkirtillinn myndi skjaldkirtilshormóna þarf nægilegt magn af joðiði að vera tiltækt fyrir lírfurnar með samblandi af vatns- og fõðurgjöfum. Sem stendur eru ekki til viðmiðunarreglur, fengnar á grundvelli reynslu, um lágmarksstyrk joðiðs. Tiltækileiki joðiðs getur þó haft áhrif á svörunargetu skjaldkirtilskerfisins gagnvart skjaldkirtilsvirkum efnum og þekkt er að það stillir grunnstarfsemi skjaldkirtilsins en það er þáttur sem verðskuldar athygli þegar niðurstöður úr vefjameinafræðilegri rannsókn á skjaldkirtlinum eru túlkaðar. Þess vegna skal gera grein fyrir mældum styrk joðiðs í prófunarvatninu. Sýnt hefur verið fram á, á grundvelli tiltækra gagna úr fullgildingarrannsóknum, að rannsóknaráætlunin reynist vel þegar styrkur joðiðs (I⁻) í prófunarvatninu er á bilinu 0,5–10 µg/l. Lágmarksstyrkleiki joðiðs í prófunarvatninu skal helst vera 0,5 µg/l. Ef prófunarvatnið er endurgert úr afjönuðu vatni skal bæta við joði í styrk að lágmarki 0,5 µg/l. Í skýrslunni skal gera grein fyrir því ef joði eða öðrum söltum er bætt í prófunarvatnið.

Eldi dýra*Umönnun og undaneldi fullvaxinna dýra*

10. Umönnun og undaneldi fullvaxinna dýra fer fram í samræmi við staðlaðar viðmiðunarreglur og að því er varðar nánari upplýsingar er lesandanum bent á staðlaðar leiðbeiningar um framkvæmd „Frog Embryo Teratogenesis Assay (FETAX)“ (6. heimild). Staðlaðar viðmiðunarreglur af þessu tagi gefa dæmi um viðeigandi aðferðir við umönnun og undaneldi en ekki er gerð krafa um að farið sé að þeim í einu og öllu. Til að framkalla æxlun eru (3–5) þör af fullvöxnum kven- og karldýrum sprautuð með æðabelgskynhormónavaka manna. Tilraunakvendýr og -karldýr eru sprautuð, annars vegar með u.þ.b. 800–1000 IU og hins vegar með 600–800 IU, með æðabelgskynhormónavaka manna sem er uppleystur í 0,6–0,9% saltlausn. Undaneldispör eru höfð í stórum tönkum, ótrufluð og í kyrrstöðu, til að hvetja til mökunarfæðmags. Í hverjum undaneldistanki skal vera falskur botn úr ryðfríu stáli eða plastmóskvar þannig að eggjamassarnir geti fallið til botns í tanknum. Froskar sem eru sprautaðir síðla dags losa yfirleitt flest sin egg fyrir miðjan morgun næsta dag. Eftir að nægilegt magn af eggjum hefur verið losað og þau frjóvguð skal fjarlægja fullvaxin dýr úr undaneldistönkunum.

Umönnun og val á lírfum

11. Eftir að búið er að fjarlægja fullvaxin dýr úr undaneldistönkunum er eggjunum safnað og lífvænleiki þeirra metinn með því að nota dæmigert undirsýni fösturvísa úr öllum undaneldistönkunum. Halda skal besta, einstaka gotinu, eða gotunum, eftir (mælt er með 2–3 til að meta gæði gotanna) á grundvelli lífvænleika fösturvísanna og að fyrir hendi sé nægilegur fjöldi fösturvísa (að lágmarki 1500). Allar lífverur sem eru notaðar í rannsókn skulu koma úr einu goti (þ.e. ekki skal blanda gotunum saman). Fösturvísarnir eru fluttir í stóran, flatan bakka eða skál og öll egg sem eru greinilega dauð eða afbrigðileg (sjá skilgreiningu í (5. heimild)) eru fjarlægð með pípettu eða dropateljara. Heilbrigðir fösturvísar úr hverju þessara þriggja gota eru settir í þrjá mismunandi klaktanka. Fjórum dögum eftir að gotin eru sett í klaktankana eru þau bestu valin á grundvelli lífvænleika og árangurs í klaki og lírfurnar fluttar í viðeigandi fjölda eldistanka við 22° ± 1 °C. Þar að auki eru nokkrar lírfur til viðbótar settar í aukatanka til notkunar sem staðgenglar ef afföll verða í eldistönkunum fyrstu vikuna. Þessi aðferð viðheldur samræmdum þéttleika lífveranna og dregur þar með úr mismunandi í þroskun innan aldursþóps einstakra gota. Hreinsa skal alla eldistanka daglega með vökvasugu. Í varúðarsýni eru vínýl- eða nitrílhanskar æskilegri en latexhanskar. Fjarlægja skal dauð dýr daglega og setja staðgengilslírfur í staðinn til að viðhalda þéttleika lífveranna fyrstu vikuna. Fóðra skal a.m.k. tvisvar á dag.

12. Meðan á fasanum á undan váhrifum stendur eru halakörturarnar látnar laga sig að aðstæðum í raunverulega váhrifafasanum, þ.m.t. tegund fódurs, hitastig, birtu- og myrkvunarhringrás og ræktunarmiðill. Þess vegna er mælt með því að nota sama ræktunar-/þynningarvatn í fasanum á undan váhrifum og í váhrifafasanum. Skipta skal alveg um ræktunarmiðil a.m.k. tvisvar í viku ef kyrrstöðuræktun er notuð til að viðhalda halakörtunum meðan á fasanum á undan váhrifum stendur. Forðast skal þrængsli vegna mikils þéttleika lirfa meðan á fasanum á undan váhrifum stendur vegna þess að slík áhrif geta haft merkjanleg áhrif á þroskun halakarta í prófunarfasanum sem á eftir kemur. Þess vegna skal eldisþéttleikinn ekki fara yfir u.þ.b. fjórar halakörtur/l af ræktunarmiðli (kyrrstöðuváhrifakerfi) eða 10 halakörtur/l af ræktunarmiðli (með t.d. 50 ml/mín streymi í forváhrifa- eða ræktunarkerfum). Við þessi skilyrði eiga halakörturarnar að þroskast frá 45./46. stigi yfir á 51. stig innan tólf daga. Skoða skal þroskunarstig dæmigerðra halakarta úr þessu stofnþýði daglega til að meta viðeigandi tímapiunkt til að hefja váhrifin. Þess skal gætt að lágmarka streitu og skaða sem halakörturarnar verða fyrir, einkum við tilflutning, þrif á kerinu og meðhöndlun á lirfum. Forðast skal streituvaldandi aðstæður/athafnir, s.s. hávær og/eða stöðug hljóð, bank í kerinu, titring í kerinu, óhóflega athafnasemi á rannsóknarstofunni og órar breytingar á umhverfismiðlum (tiltækileiki birtu, hitastig, sýrustig, uppleyst súrefni, vatnsstreymi o.s.frv.). Ef halakörturarnar þroskast ekki yfir á 51. stig innan 17 daga eftir frjógvun gæti of mikilli streitu verið um að kenna.

Lirfuræktun og -fóðrun

13. Halakörtur eru fóðraðar, t.d. á halakörtufóðri sem hægt er að kaupa og notað er í fullgildingarrannsóknnum (sjá einnig 1. viðbæti), á öllu tímabilinu á undan váhrifum (eftir 45./46. stig samkvæmt Nieuwkoop og Faber (NF) (8. heimild)) og á öllu prófunartímabilinu, í 21 dag, eða öðru fóðri sem sýnt hefur verið fram á að veiti sama greiningarothæfi á myndbreytingu hjá froskdýrum. Laga skal fyrirkomulag fóðrunar á tímabilinu á undan váhrifunum vandlega að því að uppfylla þarfir halakartanna sem eru að þroskast. Það er að segja, fóðra skal nýklaktar halakörtur á litlum fódurskömmtum nokkrum sinnum á dag, (a.m.k. tvisvar). Forðast skal of mikið fóður til að i. viðhalda vatnsgæðum og ii. koma í veg fyrir að síur í tálknum stíflist af fódurögnum og mylsnu. Að því er varðar halakörtufóður sem notað er í fullgildingarrannsóknnum skal auka daglegan fódurskammt samhliða vexti halakartanna í u.þ.b. 30 mg/dýr/dag stuttu áður en prófunin hefst. Komið hefur í ljós í fullgildingarrannsóknnum að þetta fóður, sem hægt er að kaupa, styður edlilegan vöxt og þroskun halakarta af tegundinni *X. laevis* og er fingerðar agnir sem haldast lengi á floti í vatnssúlunni og skolast út með straumnum. Þess vegna skal skipta daglegu fódurmagni í smærri skammta og fóðra a.m.k. tvisvar á dag. Fóðrunarfyrirkomulagið fyrir þetta fóður er tilgreint í töflu 1. Fódurmagnið skal skráð. Fóðrið má gefa þurr eða sem stofnlausn sem er tilreidd í þynningarvatni. Slík stofnlausn skal nýlögðu annan hvorn dag og geymd við 4 °C þegar hún er ekki í notkun.

Tafla 1

Fyrirkomulag fóðrunar með halakörtufóðri, sem hægt er að kaupa, sem er notað í fullgildingarrannsóknnum á halakörtum af tegundinni *X. laevis* á lífshluta greiningar á myndbreytingu hjá froskdýrum við gegnumstreymiskilyrði

Rannsóknardagur	Fódurskammtur (mg fóður/dýr/dag)
0–4	30
5–7	40
8–10	50
11–14	70
15–21	80

Efnagreining

14. Áður en rannsókn fer fram skal meta stöðugleika prófunaríðefnisins með fyrirbyggjandi upplýsingum um leysni þess, niðurbrjótanleika og rokgirni. Taka skal sýni úr prófunarlausnum fyrir hvern styrkleika úr hverjum tanki samhliða prófunar til efnagreiningar við upphaf prófunar (dagur 0) og vikulega meðan prófunin stendur yfir, að lágmarki fjögur sýni. Einnig er mælt með því að hver prófunarstyrkur sé greindur meðan kerfið er undirbúið, áður en prófun hefst, til að sannreyna nothæfi kerfisins. Auk þess er mælt með því að stofnlausnir séu greindar þegar skipt er um þær, einkum ef rúmmál stofnlausnarinnar inniheldur ekki nægilegt magn af íðefni til að endast meðan venjubundið sýnatökutímabil stendur yfir. Ef um er að ræða íðefni, sem ekki er hægt að greina í sumum eða öllum styrkleikum sem notaðir eru í prófuninni, skal mæla stofnlausnir og skrá kerfisstreymi til að reikna út nafnstyrkleika.

Íðefnagjöf

15. Aðferðin sem notuð er til að setja íðefnið í kerfið getur verið breytileg, háð eðlisefnafræðilegum eiginleikum þess. Hægt er að leysa vatnsleysanleg íðefni upp í deiliskömmtum af prófunarvatni í styrk sem gefur markprófunarstyrkinn í gegnumstreymiskerfi. Íðefni, sem eru fljótandi við stofuhita og torleysanleg í vatni, er hægt að setja í með því að nota vökva: vökvamettunaraðferðir. Íðefni, sem eru föst efni við stofuhita og torleysanleg í vatni, er hægt að setja í með því að nota mettunarsúlur með glerull (7. heimild). Ákjósanlegast er að nota prófunarkerfi án burðarefnis en þó búa mismunandi prófunaríðefni yfir breytilegum eðlisefnafræðilegum eiginleikum sem munu líklega krefjast mismunandi aðferða við tilreiðslu á íðefnaváhrifavatni. Ákjósanlegt er að reyna eftir megni að forðast leysa eða burðarefni sökum þess að: i. tilteknir leysar geta sjálfir leitt til eiturrhifa og/eða óæskilegra eða óvæntra áhrifa á efnaskipti og innkirtla, ii. prófanir á íðefnum ofan við vatnsleysni þeirra (eins og getur oft gerst með notkun leysa) geta leitt til ónákvæmra ákvarðana á hristyrk og iii. notkun á leysum í lengri prófunum getur leitt til verulegrar „örveruþekju“ sem tengist virkni örvera. Að því er varðar íðefni sem er erfitt að gera prófanir á er hægt að nota leysi sem síðasta úrræði og fletta skal upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir í vatni á eiturrhifum íðefna og blandna, sem erfitt er að gera prófanir á (e. *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (4. heimild) til að ákvarða bestu aðferðina. Val á leysi ákvarðast af efnafræðilegum eiginleikum íðefnisins. Leysar, sem sýnt hefur verið fram á að séu árangursríkir við prófanir á eiturrhifum í vatni, eru m.a. asetón, etanól, metanól, dímetýlfórmasíð og tríetýlenglýkól. Ef leysir er notaður sem burðarefni skal styrkur leysisins vera undir styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC); í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar er mælt með að hámarki 100 µl/l; í nýlegri endurskoðun er mælt með því að nota leysi í styrk niður í 20 µl/l af þynningarvatni (12. heimild). Ef leysar er notaðir sem burðarefni skal meta viðeigandi samanburðarprófanir með leysi til viðbótar við samanburðarprófanir án leysis (hreint vatn). Ef ekki er mögulegt að gefa íðefni með vatninu, annað hvort vegna eðlisefnafræðilegra eiginleika (lítill leysni) eða takmarkaðs tiltækileika íðefnisins, má taka til athugunar að gefa það í fóðrinu. Undirbúningsvinna í tengslum við fæðutengd váhrif hefur farið fram; þó er þessi váhrifaleið yfirleitt ekki notuð. Val á aðferð skal skjalfest og sannreynt með greiningu.

Val á prófunarstyrkleikum

Hár prófunarstyrkur fastsettur

16. Að því er varðar þessa prófun skal fastsetja háan prófunarstyrk við leysnimörk prófunaríðefnisins, hámarksþolsstyrk fyrir íðefni með bráð eiturrhif eða 100 mg/l, eftir því hvert gildanna er lægst.
17. Hámarksþolsstyrkur er skilgreindur sem hæsti prófunarstyrkur íðefnisins sem leiðir til innan við 10% bráðra affalla. Með notkun þessarar aðferðar er gengið út frá því að til séu gögn um bráð afföll, sem byggð eru á athugunum, sem hægt er að áætla hámarksþolsstyrkinn út frá. Mat á hámarksþolsstyrk getur verið ónákvæmt og alla jafna þarf sérfræðiálit af einhverju tagi. Þó svo að notkun aðhvarfslíkans geti tæknilega séð verið traustasta nálgunin til að meta hámarksþolsstyrk er hægt að leiða gagnlega nálgun á hámarksþolsstyrk út frá fyrirbyggjandi bráðagögnum með því að nota 1/3 af gildinu fyrir bráðan LC₅₀. Þó getur vantað gögn um bráð eiturrhif á þær tegundir sem verið er að gera prófanir á. Ef tegundarsértæk gögn um bráð eiturrhif eru ekki tiltæk er hægt að ljúka við 96-klst LC₅₀-prófun með halakörtum sem eru dæmigerðar (þ.e. sama stig) fyrir þær sem eru til prófunar í greiningu á myndbreytingu hjá froskdýrum. Ef gögn um aðrar lagartegundir eru tiltækar (t.d. LC₅₀-rannsóknir á fiskum eða öðrum froskdýrategundum) er valfrjálst að nota sérfræðiálit til að meta líklegan hámarksþolsstyrk á grundvelli framreiknings innan tegunda.

18. Að öðrum kosti, ef iðefnið veldur ekki bráðum eituhrifum og er leysanlegt yfir 100 mg/l skal líta svo á að 100 mg/l sé hæsti prófunarstyrkurinn þar eð þessi styrkur er almennt talinn „nánast óeitraður“.
19. Þó að kyrrstöðuaðferð með endurnýjun sé ekki sú aðferð sem mælt er með má þó nota hana ef gegnumstreymisaðferðir eru ófullnægjandi til að ná hámarksþolsstyrk. Ef notaðar eru kyrrstöðuaðferðir með endurnýjun skal skjalfesta stöðugleika prófunariðefnisstyrksins og hann skal haldast innan marka nothæfisviðmiðana. Mælt er með 24 klukkustunda endurnýjunartímabilum. Endurnýjunartímabil sem standa lengur en 72 klst eru ekki ásættanleg. Til viðbótar skal mæla vatnsgæðabreytur (t.d. uppleyst súrefni, sýrustig o.s.frv.) við lok hvers endurnýjunartímabils, rétt fyrir endurnýjun.

Prófunarstyrkleikasvið

20. Gerð er krafa um að lágmarki þrjá prófunarstyrkleika og samanburð með hreinu vatni (og samanburð með burðarefni ef nauðsyn krefur). Lágmarksmunur milli hæsta og lægsta prófunarstyrks skal vera u.þ.b. eitt tugaprep. Mesti aðskilnaður milli skammtana er 0,1 og minnsti 0,33.

VERKFERLI

Upphaf prófunar og framkvæmd

Dagur 0

21. Váhrif skulu hafin þegar nægilegur fjöldi halakarta í stofnþýðinu, á undan váhrifunum, hefur náð 51. þroskunarstigi samkvæmt Nieuwkoop og Faber (8. heimild) og sem eru 17 daga gamlar eða yngri eftir frjóvgun. Til að velja tilraunadýr skal setja heilbrigðar halakörtur, sem líta eðlilega út, úr stofnþýðinu saman í eitt flát sem inniheldur viðeigandi magn af þynningarvatni. Til að ákvarða þroskunarstig skal taka halakörturarnar eina og eina í senn úr safntanknum með litlum háfi eða síu og flytja þær í gagnsætt mælihölf (t.d. 100 mm petrískál) sem inniheldur þynningarvatn. Ákjósanlegast er að nota ekki svæfingu til að ákvarða þroskunarstig, þó er hægt að svæfa halakörturarnar hverja fyrir sig með því að nota 100 mg/l trikaínmetansúlfónat (t.d. MS-222), jafnað á viðeigandi hátt með natríumbíkarbónati (pH-gildi 7,0), fyrir meðhöndlun. Ef svæfing er notuð skal aðferðin við rétta notkun, t.d. á MS-222, koma frá rannsóknarstofum með reynslu og gefin skýrsla um það með prófunarniðurstöðunum. Meðhöndla skal dýrin varlega við þennan flutning til að lágmarka streitu vegna meðhöndlunar og til að forðast hvers kyns áverka.
22. Þroskunarstig dýranna er ákvarðað með tvíæissmásjá til krufningar. Til að draga úr endanlegum breytileika á þroskunarstiginu er mikilvægt að þessi stigsákvörðun sé framkvæmd eins nákvæmlega og hægt er. Samkvæmt Nieuwkoop og Faber (8. heimild) er fyrsta þroskunarstigið við val á lífverum á 51. stigi forms og bygging afturfóta. Útlitsleg einkenni afturfótanna skulu skoðuð í smásjánni. Þó að fletta eigi upp í heildarleiðbeiningum Nieuwkoop og Faber (8. heimild) til að fá ítarlegar upplýsingar um stigsákvörðun halakarta er hægt að ákvarða stig á áreiðanlegan hátt með því að nota áberandi, formfræðileg kennimörk. Hægt er að nota eftirfarandi töflu til að einfalda og staðla ferli við stigsákvörðun í allri rannsókninni með því að greina þau áberandi, formfræðilegu kennimörk sem tengjast mismunandi stigum, að því gefnu að þroskun sé eðlileg.

Tafla 2

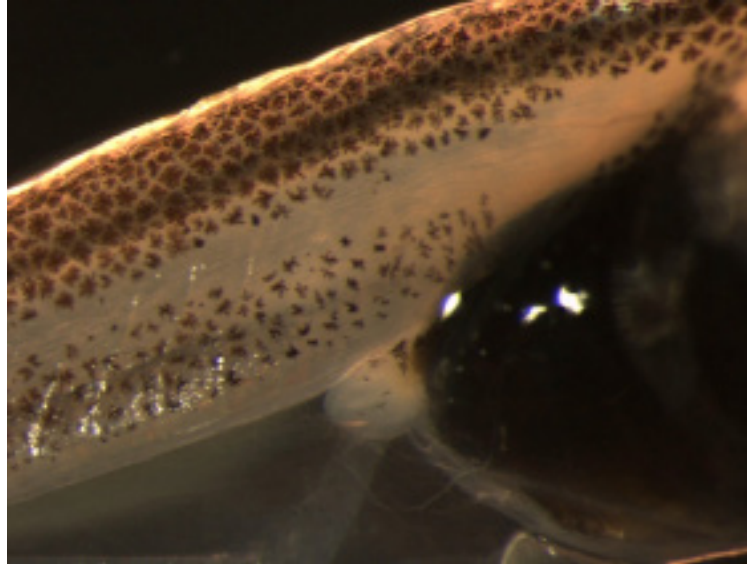
Áberandi, formfræðileg kennimörk vegna stigsákvörðunar, byggð á leiðbeiningum Nieuwkoop og Faber

Áberandi formfræðileg kennimörk	Þroskunarstig															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Afturfótur	X	X	X	X	X	X	X									
Framfótur						X	X	X	X	X						
Kúpu- og andlitsbygging										X	X	X	X			
Form og bygging lyktartaugar											X	X	X			
Lengd hala													X	X	X	X

23. Við upphaf prófunar skulu allar halakörtur vera á 51. stigi. Þau formfræðilegu kennimörk stigsákvörðunar sem eru mest áberandi á því stigi eru form og bygging afturfóta, sem sýnd er á mynd 1.

Mynd 1

Form og bygging afturfótar á halakörtum af tegundinni X. laevis á 51. stigi



24. Til viðbótar við val á þroskunarstigi er hægt að velja tilraunadýrin eftir stærð (valkvætt). Í þessu skyni skal mæla alla bollengdina (ekki lengd frá snoppu að þarfagangi) á degi 0 til að fá undirsýni með u.þ.b. 20 halakörtum á 51. stigi samkvæmt Nieuwkoop og Faber. Eftir að meðaltal allrar bollengdar fyrir þennan dýrahóp hefur verið reiknað út er hægt að fastsetja lágmarks- og hámarksgildi fyrir alla bollengd tilraunadýranna þannig að bilið fyrir meðalgildið geti verið ± 3 mm (meðalgildi allrar bollengdar er á bilinu 24,0–28,1 mm fyrir halakörtur á 51. stigi). Þó er þroskunarstigsákvörðun aðalbreytan við að ákvarða hvort hvert tilraunadýr um sig er tilbúið. Halakörtur, sem eru áberandi vanskapaðar eða með áverka, skulu útilokaðar í greiningunni.
25. Halakörtur sem uppfylla stigsviðmiðanirnar sem lýst er hér að framan eru hafðar í tanki með hreinu ræktunaratni þar til stigsákvörðunarferlinu er lokið. Um leið og stigsákvörðun er lokið er lirfunum dreift af handahófi í váhrifameðhöndlunartanka þar til hver tankur inniheldur 20 lirfur. Síðan er hver meðhöndlunartankur skodaður m.t.t. dýra sem líta óeðlilega út (t.d. með áverka, óeðlilegt sundatferli o.s.frv.). Halakörtur, sem eru augljóslega ekki heilbrigðar, skulu fjarlægðar úr meðhöndlunartanknum og í staðinn skal setja lirfur sem eru nývaldar úr safntanknum.

Athuganir

26. Ítarlegri upplýsingar um verkferli við lok prófunar og meðferð á halakörtum er að finna í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um skjaldkirtilsvefjafræði froskdýra (*OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology*) (9. heimild).

Mælingar á 7. degi

27. Á 7. degi eru fimm halakörtur, sem valdar eru af handahófi úr hverri samhlíða prófun, teknar úr hverjum prófunartanki. Handahófsaðferðin, sem er notuð, ætti að gefa hverju dýri í prófuninni jafn miklar líkur á að vera valið. Þessu er hægt að ná fram með hvaða handahófsaðferð sem er en krefst þess að hver halakarta um sig sé veidd í háf. Halakörtur, sem ekki eru valdar, eru settar aftur í upprunatankinn og halakörtur, sem eru valdar, eru aflifaðar á mannúðlegan hátt í 150–200 mg/l, t.d. MS-222, jafnað á viðeigandi hátt með natríumbíkarbónati til að ná pH-gildinu 7,0. Aflífuðu halakörtur eru skolaðar með vatni og þerraðar, síðan er líkamsþyngd ákvörðuð að næsta milligrammi. Lengd afturfóta, lengd frá snoppu að þarfagangi og þroskunarstig (með því að nota tvísæissmásjá til krufningar) eru ákvörðuð fyrir hverja halakörtu.

Mælingar á 21. degi (lok prófunar)

28. Við lok prófunar (21. dagur) eru þær halakörtur sem eftir eru teknar úr prófunartönkunum og aflífaðar á mannúðlegan hátt í 150–200 mg/l, t.d. MS-222, jafnað á viðeigandi hátt með natríumbíkarbónati, eins og fram kemur hér að ofan. Halakörturarnar eru skolaðar með vatni og þerraðar, síðan er líkamsþyngd ákvörðuð að næsta milligrammi. Þroskunarstig, lengd frá snoppu að þarfagangi og lengd afturfóta eru mæld hjá hverri halakörtu.
29. Allar lirlurnar eru settar í Davidsons-festiefni í 48–72 klst., annaðhvort sem heil skrokksýni eða sem afskorin hausvefjasýni, sem innihalda neðri kjálkann, til vefjafræðilegs mats. Að því er varðar vefjameinafræðilega rannsókn skal taka sýni úr alls fimm halakörtum út hverjum tanki samhliða prófunar. Þar eð frumuhæð í skjaldkirtilsbúi (e. *follicular cell height*) er stigsháð (10. heimild) er sú sýnatökuaðferð sem hentar best til vefjafræðilegrar greiningar að nota einstaklinga á sama stigi þegar unnt er. Í því skyni að velja einstaklinga sem eru á sama stigi skal fyrst stigsákvæða allar lirlurnar áður en val og síðan vinnsla til gagnaöflunar og varðveisla fara fram. Þetta er nauðsynlegt vegna þess að eðlilegt misræmi í þroskun mun leiða til mismunandi stigsdreifingar í hverjum tanki samhliða prófunar.
30. Dýr, sem eru valin til vefjameinafræðilegrar rannsóknar (n = 5 úr hverjum tanki samhliða prófunar), skulu vera á miðgildisstigi samanburðarins (safnsýni samhliða prófunar) þegar unnt er. Ef það eru fleiri en fimm lirlur á rétta stiginu í einhverjum tönkum samhliða prófana skal velja fimm lirlur af handahófi.
31. Ef það eru færri en fimm lirlur á rétta stiginu í einhverjum tönkum samhliða prófunar skal velja fimm dýr af handahófi af næsta þroskunarstigi fyrir ofan eða neðan til að ná heildarúrtaksstærðinni fimm lirlur á hvern tank samhliða prófunar. Æskilegast er að ákvörðun um að taka sýni úr fleiri lirlum, annaðhvort af næsta þroskunarstigi fyrir neðan eða ofan, sé tekin á grundvelli heildarmats á stigsdreifingu í samanburðarprófunum og prófunum með meðhöndlun með íðefnum. Ef meðhöndlunin með íðefnum tengist seinkun á þroskun skal taka sýni úr fleiri lirlum á næsta þroskunarstigi fyrir neðan. Ef meðhöndlun með íðefnum tengist aftur á móti hröðun á þroskun skal taka sýni úr fleiri lirlum á næsta þroskunarstigi fyrir ofan.
32. Ef um er að ræða tilvik þar sem þroskun halakarta hefur breyst mikið vegna meðhöndlunar með prófunariðefni er e.t.v. engin skörun á stigsdreifingu í prófunum með meðhöndlun með íðefnum og útreiknuðu miðgildisþróunarstigi í samanburðarprófununum. Einungis í þessum tilvikum skal aðlaga valferlið með því að nota annað stig en miðgildisstigið í samanburðinum til að ná sýnum af lirlum, sem eru á sama stigi, til vefjameinafræðilegrar rannsóknar á skjaldkirtli. Ef stigin eru óljós (þ.e. ósamstilling) skal enn fremur velja 5 halakörtur af handahófi úr hverjum tanki samhliða prófunar til vefjafræðilegrar greiningar. Gera skal grein fyrir grunnforsendum fyrir sýnatöku úr öllum lirlum sem eru ekki á stigi sem svarar til miðgildisþróunarstigs í samanburðinum.

Ákvörðun á líffræðilegum endapunktum

33. Meðan á 21 dags váhrifafasanum stendur eru framkvæmdar mælingar á helstu endapunktum á 7. og 21. degi; þó er nauðsynlegt að athuga tilraunadýrin daglega. Í töflu 3 er að finna yfirlit yfir endapunktamælingar og samsvarandi athugunartímamarkna. Ítarlegri upplýsingar um tæknilegar aðgerðir til að mæla endapunkta og vefjafræðileg mót eru tiltækar í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar (9. heimild).

Tafla 3

Athugunartímamarkna fyrir helstu endapunkta í greiningu á myndbreytingu hjá froskdýrum

Endapunktur	Daglega	Dagur 7	Dagur 21
— Dánartíðni	.		
— Þroskunarstig		.	.
— Lengd afturfóta		.	.
— Lengd frá snoppu að þarfagangi		.	.
— Líkamsþyngd (blautvigt)		.	.
— Vefjafræði skjaldkirtils			.

Endapunktur

34. Þroskunarstig, lengd afturfóta, lengd frá snoppu að þarfagangi og blautvigti eru endapunktur greiningar á myndbreytingu hjá froskdýrum og hér á eftir er fjallað stuttlega um hvert atriði fyrir sig. Frekari tæknilegar upplýsingar um söfnun þessara gagna er að finna í leiðbeiningarskjólum sem vísað er í, þ.m.t. verkferli við tölvustudda greiningu sem mælt er með að nota.

Þroskunarstig

35. Þroskunarstig halakarta af tegundinni *X. laevis* er ákvarðað með því að nota stígsákvörðunarviðmiðanir Nieuwkoop og Faber (8. heimild). Gögn um þroskunarstig eru notuð til að ákvarða hvort þroskun er hröðuð, ósamhæfð, seinkuð eða hefur ekki orðið fyrir áhrifum. Hröðun eða seinkuð þroskun er ákvörðuð með því að bera saman miðgildisstígið í samanburðar- og meðhöndlunarhópunum. Ósamhæfð þroskun er skráð þegar vefir, sem eru rannsakaðir, eru hvorki vanskapaðir né afbrigðilegir en hlutfallsleg tímasetning formþroskunar eða þroskunar á mismunandi vefjum einnar halakörtu hefur orðið fyrir truflun.

Lengd afturfóta

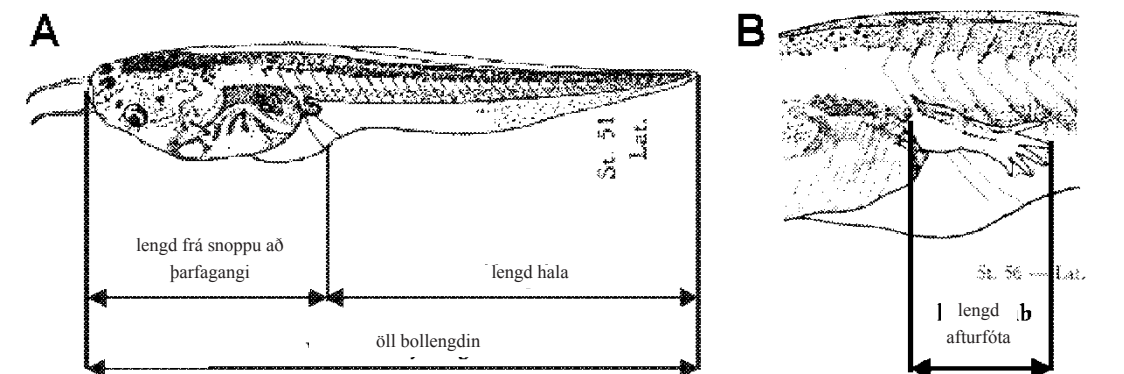
36. Sérhæfingu og vexti afturfóta er stýrt af skjaldkirtilshormónum og eru helstu þroskunarkennimörkin sem þegar eru notuð við að ákvarða þroskunarstig. Þroskun afturfóta er notuð á eigindlegan hátt við ákvörðun á þroskunarstigi en hér er litið á hana sem meginlegan endapunkt. Þess vegna er lengd afturfótar mæld sem endapunktur til að greina áhrif á skjaldkirtilsöxulinn (mynd 2). Vegna samkvæmni er lengd afturfótar mæld á vinstri fætinum. Lengd afturfótar er metin, bæði á 7. og 21. degi prófunarinnar. Á 7. degi er einfalt að mæla lengd afturfótar eins og sýnt er á mynd 2. Hins vegar er flóknara að mæla lengd afturfótar á 21. degi vegna þess að fóturinn beygist. Þess vegna skal lengd afturfótar á 21. degi mæld frá skilunum við skrokkinn (e. *body wall*) og miðlínu fótans fylgt yfir allar beygjur. Breytingar á lengd afturfótar á 7. degi eru taldar mikilvægar, að því er varðar hugsanlega skjaldkirtilsvirkni, þó að þær sjáist ekki á 21. degi. Lengdarmælingar eru fengnar af stafrænum ljósmyndum með notkun myndgreiningarhugbúnaðar eins og lýst er í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um skjaldkirtilsvefjafræði froskdýra (*OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology*) (9. heimild).

Bollengd og blautvigti

37. Ákvarðanir á lengd frá snoppu að þarfagangi (mynd 2) og blautvigti eru teknar með í aðferðarlýsingu prófunar til að meta hugsanleg áhrif prófunariðefna á vaxtarhraða halakarta, samanborið við samanburðarhópinn, og eru gagnlegar við greiningu á almennum eiturrhifum prófunariðefnisins. Þar eð það getur valdið halakörtunum streitu að fjarlægja vatn sem loðir við þær, við ákvörðun á þyngd, og það getur valdið húðskemmdum eru þessar mælingar framkvæmdar á halakörtum úr undirsýni á 7. degi og á öllum halakörtum sem eftir eru við lok prófunarinnar (21. dagur). Vegna samkvæmni skal nota efri brún þarfagangsins sem halamörk (e. *caudal limit*) mælinganna.
38. Lengd frá snoppu að þarfagangi er notuð til að meta vöxt halakörtunnar eins og sýnt er á mynd 2.

Mynd 2

A) Tegund bollengdarmælinga og B) Mælingar á lengd afturfótar á halakörtum af tegundinni *X. laevis* (1. heimild)



Vefjafræði skjaldkirtils

39. Þótt þroskunarstig og lengd afturfóta séu mikilvægir endapunktur til að meta váhrifatengdar breytingar á myndbreytingarþroskun er ekki hægt að líta á seinkaða þroskun eina og sér sem greiningarvísbendingu um and-skjaldkirtilsvirgni. Sumar breytingar eru einungis sýnilegar við venjubundna vefjameinafræðilega greiningu. Greiningarviðmiðanir fela í sér ofstækkun/rýrnun skjaldkirtils, frumuofstækkun í skjaldkirtilsbúi, frumuofvöxt í skjaldkirtilsbúi og, sem fleiri eigindlegar viðmiðanir: holsvæði í skjaldkirtilsbúi, eiginleika kvöðu og frumuhæð/-lögun í skjaldkirtilsbúi. Gera skal grein fyrir alvarleikaflokkun (4 flokkar). Upplýsingar um hvernig eigi að taka sýni til vefjafræðilegrar greiningar og vinna þau og hvernig eigi að framkvæma vefjafræðilega greiningu á vefjasýnum er að finna í „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation“ og „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas“ (9. heimild). Rannsóknarstofur, sem framkvæma greininguna í fyrsta sinn, skulu leita ráða hjá reyndum meinafræðingum til þjálfunar áður en þær ráðast í vefjafræðilega greiningu og mat á skjaldkirtlinum. Augljósar og marktækar breytingar á endapunktum, sem benda til hröðunar eða ósamstillingar á þroskun, geta gert óþarft að framkvæma vefjameinafræðilega greiningu á skjaldkirtlinum. Ef augljósar formfræðilegar breytingar eða sannanir fyrir seinkaðri þroskun eru ekki fyrir hendi réttlætir það þó vefjafræðilega greiningu.

Dánartíðni

40. Leitað skal að dauðum halakörtum daglega í öllum prófunartönkum og skrá fjöldann fyrir hvern tank. Ef vart verður við afföll skal skrá dagsetningu, styrk og númer tanks. Fjarlægja skal dauð dýr úr prófunartanknum um leið og eftir þeim er tekið. Dánarhlutfall yfir 10% getur bent til þess að prófunarskilyrði séu óviðeigandi eða til eiturrhifa prófunariðefnisins.

Viðbótarathuganir

41. Skrá skal tilvik um óeðlilegt atferli og áberandi vansköpun og vefjaskemmdir. Ef vart verður við óeðlilegt atferli, mikla vansköpun eða vefjaskemmdir skal skrá dagsetningu, styrk og númer tanks. Eðlilegt atferli einkennist af því að halakörturnar haldast á floti í vatnssúlunni með halann ofar hausnum, slá halaugganum taktfast til, koma reglulega upp á yfirborðið til að anda og bregðast við áreiti. Óeðlilegt atferli tekur m.a. til þess að fljóta á yfirborðinu, liggja á botni tanksins, öfugar eða skrykkjóttar sundhreyfingar, fara ekki upp á yfirborðið og sýna engin viðbrögð við áreiti. Auk þess skal skrá mikinn mun á fóduráti milli meðhöndlunarhópa. Mikil vansköpun og vefjaskemmdir geta tekið til formfræðilegs afbrigðileika (t.d. vanskapaðir útlímur), blæðandi vefjaskemmdir, bakteríu- eða sveppasýkingar, svo að eitthvað sé nefnt. Þessar greiningar eru eigindlegar og líta skal svo á að þær svari til klínískra einkenna um sjúkdóm/streitu og þær skulu gerðar með samanburði við samanburðardýrin. Ef fyrircoma eða tíðni er meiri í váhrifatönkum en í samanburðartönkum skal líta á það sem sannanir fyrir augljósum eiturrhifum.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gagnasöfnun

42. Safna skal öllum gögnum með því að nota rafræn eða handvirk kerfi sem eru í samræmi við góðar starfsvenjur við rannsóknir. Í rannsóknargögnum skal koma fram:

Prófunariðefni:

- lýsing á eiginleikum prófunariðefnis: eðlisefnafræðilegir eiginleikar; upplýsingar um stöðugleika og lífbrjótanleika,
- efnafræðilegar upplýsingar og gögn: aðferð og tíðni við tilreiðslu þynninga, upplýsingar um prófunariðefni ná yfir raun- og nafnstyrk prófunariðefnis og í sumum tilvikum yfir íðefni sem er ekki upprunalegt, eins og við á. Mælingar á prófunariðefninu kunna að reynast nauðsynlegar fyrir stofnlausnir sem og fyrir prófunarlausnir,
- leysis (ef annar en vatn): rökstuðningur fyrir vali á leysi og lýsing á eiginleikum leysis (eðli, styrkur sem er notaður).

Prófunarskýrði:

- starfræksluskrár: þær samanstanda af athugunum sem varða virkni prófunarkerfis og stuðningsumhverfi ásamt innviðum. Dæmigerðar skrár ná yfir: umhverfishita, prófunarhitastig, ljóslotu, stöðu mikilvægra þátta í váhrifakerfinu (t.d. dælur, lotuteljara, þrýsting), streymi, vatnshæð, stofnflöskuskipti og fæðunarskrár. Almennar gæðabreytur vatns ná yfir: sýrustig, uppleyst súrefni, eðlisleiðni, heildarjod, basavirkni og hörku,
- frávik frá prófunaraðferðinni: þessar upplýsingar skulu innihalda allar upplýsingar eða lýsingar í samfelldu máli á frávikum frá prófunaraðferðinni.

Niðurstöður:

- Líffræðilegar athuganir og gögn: þessi ná yfir daglegar athuganir á afföllum, fæðurát, óeðlilega sundhegðun, sinnuleysi, jafnvægisleysi, vansköpun, vefjaskemmdir o.s.frv. Athuganir og gögn sem safnað er með fyrir fram ákveðnu millibili eru m.a.: þroskunarstig, lengd afturfóta, lengd frá snoppu að þarfagangi og blautvigti,
- tölfræðilegar greiningaraðferðir og rökstuðningur fyrir aðferðum sem notaðar eru; æskilegast er að setja niðurstöður tölfræðilegrar greiningar fram í töflum,
- vefjafræðileg gögn: þessi ná yfir lýsingar í samfelldu máli sem og alvarleikastig og tíðni sértækra athugana eins og lýst er í leiðbeiningarskjali um vefjameinafræði,
- sértækar athuganir: þessar athuganir skulu ná yfir lýsingar í samfelldu máli á rannsókninni sem passa ekki inn í áður lýsta flokka.

Skýrslugjöf um gögn

43. Í 2. viðbæti er að finna töflureikni fyrir daglega gagnasöfnun sem hægt er að nota til leiðbeiningar við að færa inn óunnin gögn og til að reikna út samanteknar tölfræðilegar upplýsingar. Að auki eru skýrslugjafartöflur sem eru hentugar til að gefa skýrslu um samantekt endapunkturtagagna. Skýrslugjafartöflur fyrir vefjafræðileg mót er að finna í 2. viðbæti.

Nothæfisviðmiðanir og tækileiki/gildi prófunar

44. Alla jafna leiða vítaverð frávik frá prófunaraðferðinni til óásættanlegra gagna vegna túlkunar eða skýrslugjafar. Þess vegna voru eftirfarandi viðmiðanir í töflu 4 þróaðar sem leiðbeiningar við að ákvarða gæði framkvæmdu prófunarinnar og almennt atferli viðmiðunarlífveranna.

Tafla 4

Nothæfisviðmiðanir fyrir greiningu á myndbreytingu hjá froskdýrum

Viðmiðun	Ásættanleg mörk
Prófunarstyrkleikar	Viðhaldið við $\leq 20\%$ FS (breytileiki mælds prófunarstyrks) í allri 21 dags prófuninni
Dánartíðni í samanburðarhópum	$\leq 10\%$ — afföll í stakri samhliða prófun í samanburðinum skulu ekki vera meiri en 2 halakörtur
Lágmarks miðgildisþroskunarstig í samanburði við lok prófunar	57
Dreifing þroskunarstiga í samanburðarhóp	Ekki skal muna meira en 4 stigum á 10. og 90. hundr- aðshlutamarki í dreifingu þroskunarstiga
Uppleyst súrefni	$\geq 40\%$ loftmettun (*)

Viðmiðun	Ásættanleg mörk
Sýrustig	pH-gildi skal haldið á bilinu 6,5–8,5. Munur milli tanka samhliða prófana/meðhöndlunartanka skal ekki fara yfir 0,5.
Vatnshiti	22 ± 1 °C — munur milli tanka samhliða prófana/meðhöndlunartanka skal ekki fara yfir 0,5 °C
Prófunarstyrkur án augljósra eiturrhifa	≥ 2
Nothæfi samhliða prófana	≤ 2 samhliða prófanir í allri prófuninni mega vera ótryggar (e. <i>compromised</i>)
Sérstök skilyrði um notkun leysis	Ef leysir er notaður skal nota bæði samanburð með leysi og samanburð með hreinu vatni og gera grein fyrir niðurstöðunum Tölfræðilega marktækur mismunur milli samanburðarhópa með leysi og samanburðarhópa með vatni er meðhöndlaður sérstaklega. Sjá nánari upplýsingar hér á eftir
Sérstök skilyrði fyrir kyrrstöðukerfi með endurnýjun	Gera skal grein fyrir dæmigerðum efnagreiningum fyrir og eftir endurnýjun Ammoníaksgildi skulu mæld rétt fyrir endurnýjun Mæla skal allar vatnsgæðabreytur, sem eru skráðar í töflu 1 í 1. viðbæti, rétt fyrir endurnýjun Tímabil milli endurnýjana skal ekki vera lengra en 72 klukkustundir Viðeigandi fæðunarfyrikomulag (50% af daglegum skammti af halakörtufóðri sem hægt er að kaupa)
(*) Hægt er að lofta vatn með loftbólunarglössum. Mælt er með því að stilla loftbólunarglösin við gildi sem skapa ekki óþarfa streitu hjá halakörtunum.	

Gildi prófananna

45. Eftirfarandi kröfur skulu uppfylltar til að prófun teljist tæk/gild:

Gild tilraun í prófun sem ákvarðast neikvæð m.t.t. skjaldkirtilsvirkni:

- 1) Að því er varðar tiltekna meðhöndlun (þ.m.t. samanburðarhópar) mega afföllin ekki fara yfir 10%. Að því er varðar hverja tiltekna samhliða prófun mega afföll ekki vera meiri en þrjár halakörtur, annars telst samhliða prófunin ótrygg
- 2) Að minnsta kosti tvö meðhöndlunarstig, með enga af fjórum samhliða prófununum ótrygga, skulu vera tiltæk til greiningar
- 3) Að minnsta kosti tvö meðhöndlunarstig án augljósra eiturrhifa skulu vera tiltæk til greiningar

Gild tilraun í prófun sem ákvarðast jákvæð m.t.t. skjaldkirtilsvirkni:

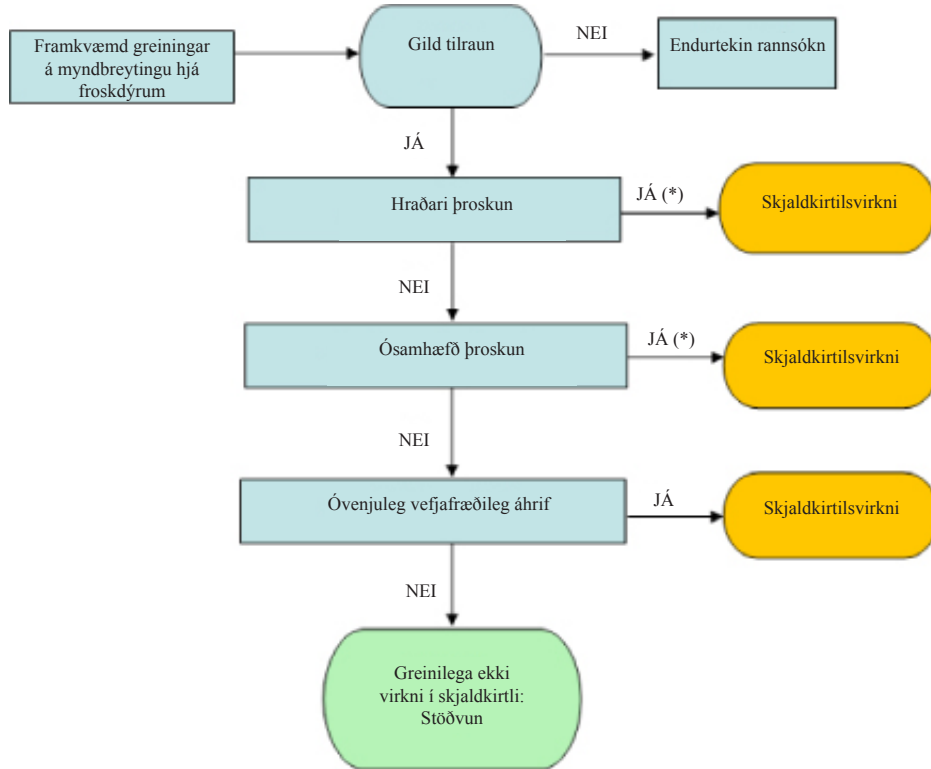
- 1) Ekki mega verða meiri afföll en tvær halakörtur/samhliða prófun í samanburðarhópnum

Ákvörðunarferli vegna framkvæmdar greiningar á myndbreytingu hjá froskdýrum

46. Ákvörðunarferli fyrir greiningu á myndbreytingu hjá froskdýrum var þróað til að veita rökrænan stuðning við framkvæmd lífgreiningarinnar og túlkun á niðurstöðunum (sjá flæðirit í mynd 3). Í þessu ákvörðunarferli, í aðalatriðum, veita endapunktarnir hraðari þroskun, ósamhæfð þroskun og vefjameinafræðileg rannsókn á skjaldkirtli þungt en seinkuð þroskun, lengd frá snoppu að þarfagangi og blautlíkamsþyngd, breytur sem geta hugsanlega orðið fyrir áhrifum af almennum eiturhrifum, veita minna.

Mynd 3

Ákvörðunarferli vegna framkvæmdar greiningar á myndbreytingu hjá froskdýrum



(*) Sum eftirlitsyfirvöld kunna að krefjast vefjafræðilegrar greiningar þrátt fyrir marktækan mun á hraðari þroskun og ósamhæfðri þroskun. Aðilinn, sem framkvæmir þessa prófun, er hvattur til að hafa samráð við nauðsynleg yfirvöld áður en prófunin er framkvæmd til að ákvarða hvaða endapunkta er krafist.

Hraðari þroskun (ákvörðuð með því að nota þroskunarstig, lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL) og lengd afturfóta (HLL))

47. Eftir því sem vitað er verður hraðari þroskun einungis vegna áhrifa sem tengjast skjaldkirtilshormónum. Þetta geta verið áhrif á útlægan vef (e. *peripheral tissue*), s.s. bein víxlverkun við skjaldkirtilshormónaviðtaka (t.d. T4) eða áhrif sem breyta skjaldkirtilshormónagildum í blóðrásinni. Hvort heldur sem er telst þetta nægileg sönnun fyrir því að íðefnið framkalli skjaldkirtilsvirkni. Hraðari þroskun er metin með tvenns konar hætti. Í fyrsta lagi er hægt að meta almennt þroskunarstig með því að nota staðalaðferðina sem er útlustuð í Nieuwkoop og Faber (8. heimild). Í öðru lagi er hægt að mægnreina tiltekin formfræðileg einkenni, t.d. lengd afturfóta, bæði á 7. og 21. degi, sem hafa jákvæð tengsl við meðverkandi áhrif á skjaldkirtilshormónaviðtakann. Ef tölfraðilega marktæk hröðun verður á þroskun afturfóta eða lengd þeirra bendir prófunin til þess að íðefnið sé skjaldkirtilsvirkt.
48. Mat á hraðaþri þroskun í tilraunadýrum, samanborið við samanburðarþýðið, verður byggt á niðurstöðum úr tölfraðilegum greiningum sem gerðar eru á eftirfarandi fjórum endapunktum:
 - lengd afturfóta (stöðluð við lengd frá snoppu að þarfagangi) á 7. degi rannsóknar
 - lengd afturfóta (stöðluð við lengd frá snoppu að þarfagangi) á 21. degi rannsóknar
 - þroskunarstig á 7. degi rannsóknar
 - þroskunarstig á 21. degi rannsóknar.
49. Tölfraðileg greining á lengd afturfóta skal gerð á grundvelli mælinga á lengd vinstri afturfótar. Lengd afturfóta er stöðluð með því að reikna út hlutfallið milli lengdar afturfóta og lengdar frá snoppu að þarfagangi hjá hverjum einstaklingi. Síðan eru meðaltöl staðlaðra gilda fyrir hvert meðhöndlunarstig borin saman. Marktæk aukning á meðallengd afturfóta (stöðluð) í hóp sem er meðhöndlaður með íðefni, samanborið við samanburðarhóp á 7. degi rannsóknar og/eða á 21. degi rannsóknar (sjá 3. viðbæti), er vísbending um hröðun á þroskun.
50. Gera skal tölfraðilegar greiningar á þroskunarstigum, byggðar á ákvörðun á þroskunarstigum samkvæmt formfræðilegum viðmiðunum sem lýst er af Nieuwkoop og Faber (8. heimild). Ef marktæk hækkun á þroskunarstigsgildum greinist með skammtabundnum fjölgreiningum (e. *multi-quantal analysis*) í hóp sem er meðhöndlaður með íðefni, samanborið við samanburðarhóp á 7. degi rannsóknar og/eða á 21. degi rannsóknar, er það vísbending um hröðun á þroskun.
51. Í prófunaraðferðinni greining á myndbreytingu hjá froskdýrum er litið svo á að marktæk áhrif á einhvern af þeim fjórum endapunktum sem getið er hér að ofan nægi sem jákvæð greining á hraðaþri þroskun. Það er að segja: marktæk áhrif á lengd afturfóta á tilteknum tímapunkti þarfnast ekki staðfestingar með marktækum áhrifum á lengd afturfóta á öðrum tímapunkti né heldur með marktækum áhrifum á þroskunarstig á þessum tiltekna tímapunkti. Enn fremur þarfnast marktæk áhrif á þroskunarstig á tilteknum tímapunkti ekki staðfestingar með marktækum áhrifum á þroskunarstig á öðrum tímapunkti né heldur með marktækum áhrifum á lengd afturfóta á þessum tiltekna tímapunkti. Vægi rökstuddra vísbendinga um hraðaða þroskun mun samt aukast ef marktæk áhrif greinast á fleiri en einum endapunkti.

Ósamhæfð þroskun (ákvörðuð með því að nota þroskunarstigsviðmiðanir)

52. Ósamhæfð þroskun einkennist af truflun á hlutfallslegri tímasetningu formþroskunar eða þroskunar á mismunandi vefjum einnar halakörtu. Vangeta til að ákvarða þroskunarstig lífveru nákvæmlega með því að nota röð formfræðilegra endapunkta sem teljast dæmigerðir á tilteknu stigi benda til þess að vefirnir þroskist ósamhæft í myndbreytingunni. Ósamhæfð þroskun er vísbending um skjaldkirtilsvirkni. Einu þekktu verkunarmátarnir sem vitað er að valdi ósamhæfðri þroskun eru áhrif af íðefnum á útlæga skjaldhormónaverkun (e. *peripheral thyroid hormone action*) og/eða á efnaskipti skjaldkirtilshormóna í vef sem er að þroskast, eins og kemur fram með joðkljúfshemlum (e. *deiodinase inhibitors*).
53. Mat á tilraunadýrum til að athuga hvort ósamhæfð þroskun er fyrir hendi, samanborið við samanburðarþýðið, verður byggt á stórsæju formfræðilegu mati á tilraunadýrunum á 7. degi rannsóknar og á 21. degi rannsóknar.
54. Lýsing Nieuwkoop og Faber (8. heimild) á eðlilegri þroskun *Xenopus laevis* fastsetur ramma til að greina raðbundna endurmyndun á eðlilegum vef. Hugtakið „ósamhæfð þroskun“ vísar einkum til þeirra frávíka í

stórsærri formfræðilegri þroskun halakarta sem hindrar endanlega ákvörðun á þroskunarstigi samkvæmt viðmiðunum Nieuwkoop og Faber (8. heimild) vegna þess að lykilorðþroskunarkennimörk sýna einkenni annarra stiga.

55. Eins og fram kemur í hugtakinu „ósamhæfð þroskun“ skal einungis hafa í huga tilvik sem sýna frávik í endurmyndunarferli tiltekinna vefja samanborið við endurmyndunarferli annarra vefja. Nokkrar dæmigerðar svipfarsgerðir eru m.a. seinkaður vöxtur framfótara eða hann vex ekki fram þrátt fyrir eðlilega eða hraðari þroskun afturfóta og halavefja eða snemmvísun á tálknum samanborið við formþroskunarstig afturfóta og halavísun. Dýr er skráð með ósamhæfða þroskun ef ekki er hægt að stigflokka það vegna þess að það uppfyllir ekki meirihluta viðmiðana fyrir þroskunarkennimörk fyrir tiltekið stig samkvæmt Nieuwkoop og Faber (8. heimild) eða ef það er mikil seinkun eða hröðun á einum eða fleiri lykileinkennum (t.d. halinn alveg visnaður en framfætur ekki komnir fram). Þetta mat er gert á eiginlegan hátt og skal rannsaka alla röð kennimarkaeinkenna sem skráð voru af Nieuwkoop og Faber (8. heimild). Þó er ekki nauðsynlegt að skrá þroskunarstig ýmissa kennimarkaeinkenna dýranna sem eru til athugunar. Dýrum, sem eru skráð með ósamhæfða þroskun, er ekki raðað eftir þroskunarstigi samkvæmt Nieuwkoop og Faber (8. heimild).
56. Helsta viðmiðunin til að tilnefna tilvik um afbrigðilega formfræðilega þroskun „ósamhæfða þroskun“ er sú að hlutfallsleg tímasetning endurmyndunar á vef og formþroskun vefja verður fyrir truflun en hins vegar eru form og bygging vefja sem verða fyrir áhrifum ekki augljóslega óeðlileg. Sem dæmi til að útskýra þessa túlkun á stórsæjum, formfræðilegum vansköpunum mun heft formþroskun afturfótara samanborið við þroskun annarra vefja uppfylla viðmiðanir um „ósamhæfða þroskun“ en hins vegar skal ekki líta á tilvik þar sem afturfætur vantar, tær eru óeðlilegar (t.d. vartáun, fjöltáun) eða aðra áberandi vansköpun á útlimum sem „ósamhæfða þroskun“.
57. Í þessu samhengi skulu helstu formfræðilegu kennimörkin, sem skal meta m.t.t. samræmde myndbreytingarferils þeirra, ná yfir formþroskun afturfóta, formþroskun framfóta, framfætur koma fram, stig halavísunar (einkum vísun halauggans) og form og byggingu höfuðs (t.d. tálknastærð og stig tálknavísunar, form og bygging neðri kjálka, framskögum Meckels-brjósk).
58. Mismunandi stórsæjar, formfræðilegar svipfarsgerðir geta komið fyrir, háð efnrænum verkunarhætti. Nokkrar dæmigerðar svipfarsgerðir eru m.a. seinkaður vöxtur framfótara eða hann kemur ekki fram, þrátt fyrir eðlilega eða hraðari þroskun afturfóta og halavefs, snemmvísun á tálknum miðað við afturfót og endurmyndun hala.

Vefjameinafræðileg rannsókn

59. Ef iðefnið veldur ekki augljósum eiturrifum og hraðar hvorki þroskun né veldur ósamhæfðri þroskun er vefjameinafræðileg rannsókn á skjaldkirtlinum metin með því að nota viðeigandi leiðbeiningarskjal (9. heimild). Ef eiturrif eru ekki fyrir hendi er seinkun á þroskun sterk vísbending um and-skjaldkirtilsvirkni en greining á þroskunarstigi er ekki eins næm og gefur ekki jafn góða greiningu og vefjameinafræðileg greining á skjaldkirtlinum. Af þessum sökum er nauðsynlegt að gerð sé vefjameinafræðileg greining á skjaldkirtlinum. Áhrif á vefjafræði skjaldkirtilsins sjást á því að áhrif á þroskun eru ekki fyrir hendi. Ef breytingar verða á vefjameinafræði skjaldkirtilsins telst iðefnið skjaldkirtilsvirkt. Ef ekki er hægt að sjá seinkun á þroskun eða vefjaskemmdir á skjaldkirtlinum telst iðefnið ekki vera skjaldkirtilsvirkt. Grunnforsendan fyrir þessari ákvörðun er sú að skjaldkirtillinn er undir áhrifum frá TSH og öll iðefni, sem breyta skjaldkirtilshormónum í blóðrásinni nægilega mikið til þess að breyta seytingu TSH, munu leiða til vefjameinafræðilegra breytinga á skjaldkirtlinum. Ýmiss konar verkunarháttur og verkunarmáti geta breytt skjaldkirtilshormónum í blóðrásinni. Þó að skjaldkirtilshormónagildi bendi til skjaldkirtilstengdra áhrifa er það þó ekki nóg til að ákvarða hvaða verkunarháttur eða verkunarmáti tengist svöruninni.
60. Þar eð þessi endapunktur hentar ekki fyrir tölfraðilega grundvallarnálgun skulu áhrif, sem tengjast váhrifum af iðefni, ákvörðuð út frá sérfræðiáliti meinafræðings.

Seinkuð þroskun (ákvörðuð með því að nota þroskunarstig, lengd afturfóta (HLL), líkamsþyngd (BW) og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL))

61. Seinkuð þroskun getur orðið vegna gangvirkja and-skjaldkirtilsvirkni og vegna óbeinna eiturrhifa. Væg, seinkuð þroskun ásamt augljósum merkjum eiturrhifa benda að öllum líkindum til ósértækra eiturrhifa. Mat á eiturrifum, sem hafa ekki áhrif á skjaldkirtil, er nauðsynlegur þáttur í prófuninni til að draga úr líkum

á falsjávæðum niðurstöðum. Óhófleg afföll eru greinileg vísbending um að önnur gangvirki eiturrifa séu fyrir hendi. Á sama hátt bendir vægur samdráttur í vexti, eins og ákvarðast af blautvigt og/eða lengd frá snoppu að þarfagangi, einnig til eiturrifa sem hafa ekki áhrif á skjaldkirtil. Greinileg vaxtaraukning sést oft í tengslum við íðefni sem hafa neikvæð áhrif á eðlilega þroskun. Af þessum sökum bendir tilvist stærri dýra ekki endilega til eiturrifa sem hafa ekki áhrif á skjaldkirtil. Þó skal aldrei treysta eingöngu á vöxt til að ákvarða skjaldkirtilseiturrif. Fremur skal nota vöxt í tengslum við þroskunarstig og vefjameinafræði skjaldkirtilsins til að ákvarða skjaldkirtilsvirkni. Einnig skal taka aðra endapunkta til athugunar við ákvörðun á augljósum eiturrifum, þ.m.t. bjúgur, skemmdir vegna blæðinga, sinnuleysi, minnkað fôðurát, stefnulaus/breytt sundhegðun o.s.frv. Ef allir prófunarstyrkleikar sýna merki um augljós eiturrif skal endurmeta prófunaríðefnið við lægri prófunarstyrkleika áður en ákvarðað er hvort íðefnið sé hugsanlega skjaldkirtilsvirkt eða -óvirkt.

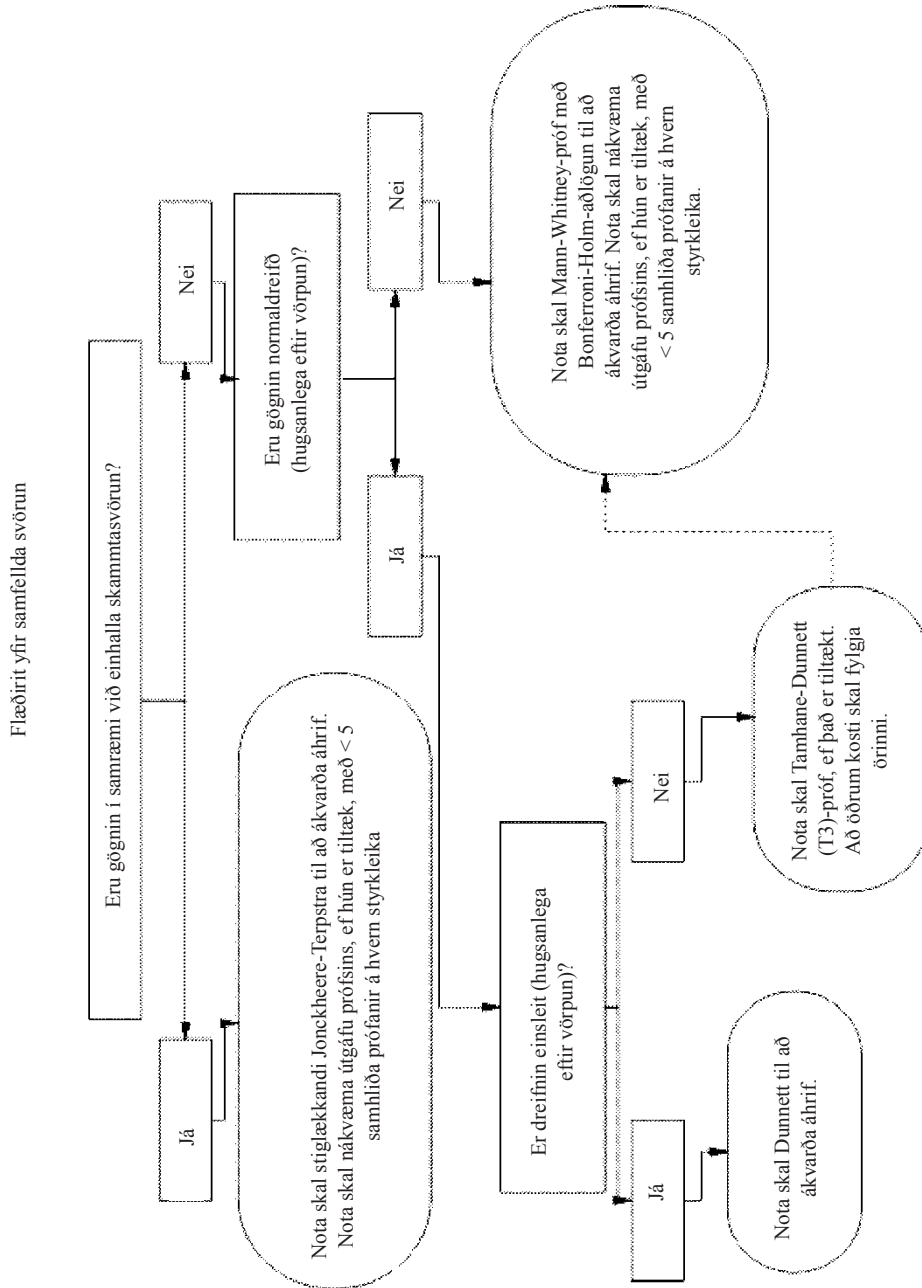
62. Tölfræðilega marktæk seinkuð þroskun bendir til þess að íðefnið sé skjaldkirtilsvirkt (mótverkandi) ef önnur augljós merki eiturrifa eru ekki fyrir hendi. Ef styrka, tölfræðilega svörun vantar er hægt að styrkja þessa niðurstöðu með niðurstöðum úr vefjameinafræðilegri rannsókn á skjaldkirtli.

Tölfræðilegar greiningar

63. Eskilegast er að tölfræðilegar greiningar á gögnunum séu samkvæmt aðferðum sem lýst er í skjalinu „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*“ (11. heimild). Að því er varðar alla samfellda, megindlega endapunkta (lengd afturfóta, lengd frá snoppu að þarfagangi, blautvigt), sem eru í samræmi við einhalla skammtasvörun, skal nota Jonckheere-Terpstra-próf með stiglækkun til að staðfesta marktæk áhrif meðhöndlunar.
64. Að því er varðar samfellda endapunkta sem eru ekki í samræmi við einhalla skammtasvörun skal meta gögnin m.t.t. normleika (æskilegast er að nota Shapiro-Wilk eða Anderson-Darling próf) og einsleitni dreifni (æskilegt er að nota Levene-próf). Bæði prófin eru framkvæmd á leifunum úr dreifnigreiningu. Hægt er að nota sérfræðiálit í stað þessara formlegu prófa á normleika og einsleitni dreifni en formleg próf eru æskileg. Ef ónormleiki (e. *non-normality*) eða misleitni dreifni kemur í ljós skal leitast við að ná dreifnistöðgun með vörpun. Ef gögnin (e.t.v. eftir vörpun) eru normaldreifð með einsleitri dreifni eru marktæk áhrif meðhöndlunar ákvörðuð með Dunnetts-prófi. Ef gögnin (e.t.v. eftir vörpun) eru normaldreifð, með misleitri dreifni, eru marktæk áhrif meðhöndlunar ákvörðuð með Tamhane-Dunnett- eða T3-prófi eða með Mann-Whitney-Wilcoxon U-prófi. Ef ekki finnst nein vörpun sem gefur stöðlun eru marktæk áhrif meðhöndlunar ákvörðuð með Mann-Whitney-Wilcoxon U-prófi með aðlöguðum p-gildum Bonferroni-Holm. Dunnetts-prófið er notað óháð öllum F-prófum í dreifnigreiningu og Mann-Whitney-prófið er notað óháð öllum Kruskal-Wallis-heildarprófum.
65. Ekki er búist við marktækum afföllum en þau skulu metin út frá stiglækkandi Cochran-Armitage-prófun þegar gögnin eru í samræmi við einhalla skammtasvörun og að öðrum kosti út frá Fisher's Exact-prófun með Bonferroni-Holm-aðlögun.
66. Marktæk áhrif meðhöndlunar á þroskunarstigið eru ákvörðuð út frá notkun á stiglækkandi Jonckheere-Terpstra-prófinu sem notað er á miðgildi samhliða prófunar. Að öðrum kosti og helst skal nota fjölskammtabundið Jonckheere-próf frá 20.–80. hundraðshlutamarki til að ákvarða áhrif það eð í því er tekið tillit til dreifingsrannsókn.
67. Samhliða prófun er viðeigandi einingin til greiningar þannig að gögnin eru sett saman úr miðgildum samhliða prófunar ef Jonckheere-Terpstra-próf eða Mann-Whitney U-próf er notað eða meðaltali samhliða prófunar ef Dunnetts-próf er notað. Hægt er að meta einhalla skammtasvörun sjónrænt út frá samhliða prófuninni og meðaltali eða miðgildi meðhöndlunarhóps eða út frá formlegum prófunum, s.s. þeim sem áður var lýst (11. heimild). Ef það eru færri en fimm samhliða prófanir á hvern meðhöndlunar- eða samanburðarhóp skal nota nákvæmu útgáfurnar af Jonckheere-Terpstra- og Mann-Whitney-prófunum með umröðunum, ef þær eru tiltækar. Tölfræðileg marktækni alla prófa sem tilgreind eru er metin við 0,05 marktækni.
68. Mynd 4 er flæðirit yfir framkvæmd tölfræðilegra prófa á samfelldum gögnum.

Mynd 4

Flæðirit yfir tölfraeðilega nálgun vegna gagna um samfellda svörun



Sérstök atriði varðandi gagnagreiningu*Notkun á ótryggum meðhöndlunarstigum*

69. Tekið er tillit til margra þátta við ákvörðun á því hvort samhliða prófun eða heil meðhöndlun sýna augljós eiturrhif og skuli tekin úr greiningunni. Augljós eiturrhif eru skilgreind sem > 2 dauðsföll í hverjum tanki samhliða prófunar sem einungis er hægt að skýra með eiturrhifum fremur en með tæknilegum mistökum. Önnur augljós merki eiturrhifa eru m.a. blæðing, óeðlilegt atferli, óeðlileg sundmynstur, lystarleysi og öll önnur klínísk einkenni sjúkdóms. Að því er varðar merki um næstum banvæn eiturrhif getur eigindlegt mat reynst nauðsynlegt og skal alltaf gert í tengslum við samanburðarhóp með hreinu vatni.

Samanburður með leysi

70. Einungis skal líta á notkun leysis sem síðasta úrræði þegar allir iðefnagjafarmöguleikar hafa verið teknir til athugunar. Ef leysir er notaður skal samtímis keyra samanburð með hreinu vatni. Við lok prófunarinnar skal framkvæma mat á hugsanlegum áhrifum leysisins. Þetta er gert með tölfræðilegum samanburði á samanburðarhópnum með leysinum og samanburðarhópnum með hreina vatninu. Mikilvægustu endapunktarnir til athugunar í þessari greiningu eru þroskunarstig, lengd frá snoppu að þarfagangi og blautvigt þar eð eiturrhif, sem hafa ekki áhrif á skjaldkirtil, geta haft áhrif á þá. Ef tölfræðilega marktækur munur greinist í þessum endapunktum milli samanburðarhópsins með hreina vatninu og samanburðarhópsins með leysinum skal ákvarða endapunkta rannsóknarinnar fyrir mældu svörunina með því að nota samanburðinn með hreina vatninu. Ef ekki er tölfræðilega marktækur munur milli samanburðarhópsins með hreina vatninu og samanburðarhópsins með leysinum á öllum mældum svarbreytum skal ákvarða endapunkta rannsóknarinnar fyrir mældu svörunina með því að nota safnsýni úr þynningarvatni og samanburði með leysi.

Meðhöndlunarhópar sem ná 60. þroskunarstigi og þar yfir

71. Eftir 60. stig minnkar stærð og þyngd halakartanna vegna vefjavísnunar og minnkunar á altæku vatnsinnihaldi. Sökum þess er ekki hægt að nota mælingar á blautvigt og lengd frá snoppu að þarfagangi á videigandi hátt í tölfræðilegum greiningum á mismunandi vaxtarhraða. Þess vegna skal stýfa gögn um blautvigt og lengd lifvera > 60 . stigi samkvæmt Nieuwkoop og Faber og ekki er hægt að nota þau í greiningar á meðaltali eða miðgildi samhliða prófunar. Hægt er að nota tvær mismunandi aðferðir til að greina þessar vaxtartengdu breytur.
72. Ein aðferð er að taka einungis halakörtur á þroskunarstigi undir eða á 60. stigi með í tölfræðilegar greiningar á blautvigt og/eða lengd frá snoppu að þarfagangi. Talið er að þessi aðferð gefi nægilega traustar upplýsingar um alvarleika hugsanlegra áhrifa á vöxt svo fremi sem einungis lítið hlutfall tilraunadýranna er tekið úr greiningunni ($\leq 20\%$). Ef aukinn fjöldi halakarta sýna þroskun sem er ofan við 60. stig ($\geq 20\%$) í einum nafnstyrkleika eða fleiri skal gera tveggja þátta dreifnigreiningu með stigskiptri dreifniskipan á öllum halakörtum til að meta áhrif á vöxt vegna meðhöndlunar með iðefnum en taka um leið tillit til áhrifa af þroskun á síðara stigi á vöxt. Í 3. viðbæti eru leiðbeiningar um tveggja þátta dreifnigreiningu á þyngd og lengd.

HEIMILDIR

- 1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.
- 2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76, Paris
- 3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92, Paris
- 4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23, Paris

- 5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA
 - 6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — *Xenopus* (FETAX). E 1439-98
 - 7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, pp. 539-551
 - 8) & Faber,J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York
 - 9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris
 - 10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599
 - 11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris
 - 12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
-

1. viðbætur

Tafla 1

Tilraunaskilyrði fyrir 21 dags greininguna á myndbreytingu hjá froskdýrum

Tilraunadýr	Lirfur af tegundinni <i>Xenopus laevis</i>	
Fyrsta lirfustig	Nieuwkoop og Faber 51. stig	
Váhrifatímabil	21 dagur	
Viðmiðanir við val á lirfum	Þroskunarstig og heildarlengd (valkvætt)	
Prófunarstyrkleikar	Að lágmarki 3 styrkleikar sem ná u.þ.b. yfir eitt tugaprep	
Váhrifafyrirkomulag	Gegnumstreymi (ákjósanlegast) og/eða kyrrstaða með endurnýjun	
Streymi prófunarkerfis	25 ml/mín. (fullkomin rúmmálsskipti á ca. 2,7 klst.)	
Helstu endapunktur/ákvörðunardagar	Dánartíðni	Daglega
	Þroskunarstig	Dagur 7 og 21
	Lengd afturfóta	Dagur 7 og 21
	Lengd frá snoppu að þarfagangi	Dagur 7 og 21
	Líkamsþyngd (blautvigt)	Dagur 7 og 21
	Vefjafræði skjaldkirtils	Dagur 21
Þynningarvatn/rannsóknarstofusamanburður	Aflklórað kranavatn (viðarkolasíað) eða jafngilt frá rannsóknarstofu	
Þéttleiki lirfa	20 lirfur/prófunarílát (5/l)	
Prófunarlausn/prófunarílát	4–10 l (10–15 cm vatn að lágmarki)/prófunarílát úr gleri eða ryðfríu stáli (t.d. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Samhliða prófun	4 ílát samhliða prófunar/prófunarstyrkur og samanburður	
Ásættanlegt dánarhlutfall í samanburðarhópum	≤ 10% á hvert ílát samhliða prófunar	
Festing – skjaldkirtill	Fjöldi festur	Allar halakörtur (5/samhliða prófun eru metnar í upphafi)
	Svæði	Haus eða allur skrokkurinn
	Festivökvi	Davidsons-festiefni

Fóðrun	Fóður	Sera Micron® eða jafngilt
	Magn/tíðni	Sjá töflu 1 varðandi fóðrunarfyrirkomulag með Sera Micron®
Lýsing	Ljóslofa	12 klst. birta: 12 klst. myrkur
	Birtustyrkur	600 til 2000 lúx (mælt við yfirborð vatns)
Vatnshiti		22° ± 1 °C
Sýrustig		6,5–8,5
Styrkur uppleysts súrefnis		> 3,5 mg/l (> 40% loftmettun)
Áætlun um sýnatöku til efnagreiningar		Einu sinni í viku (4 sýni úr hverri prófun)

2. viðbætur

Skýrslugjafartölur fyrir óunnin gögn og samantektargögn

Tafla 1

Almennar upplýsingar um prófunariðefni

Efnafræðilegar upplýsingar		
Setjið inn prófunariðefni, styrkeiningar og meðhöndlunir		
Prófunariðefni:		
Styrkeiningar:		
Meðhöndlun 1		
Meðhöndlun 2		
Meðhöndlun 3		
Meðhöndlun 4		
Dagsetning (dagur 0):		Setjið inn dagsetningu (dd/mm/áá)
Dagsetning (dagur 7):		Setjið inn dagsetningu (dd/mm/áá)
Dagsetning (dagur 21):		Setjið inn dagsetningu (dd/mm/áá)

Tafla 2

Söfnunarblöð fyrir óunnin gögn fyrir 7. og 21. dag

DAGUR X

DAGS. 00/00/00

	Styrkur	Meðhöndlun nr.	Samhliða prófun nr.	Númer einstaklings	Kennimerki einstaklings	Þroskunarstig	Lengd frá snoppu að þarfagangi (mm)	Lengd afturfóta (mm)	Blautvigt allrar lífverunnar (mg)
RÖÐ	MEDH.	MEDH. NR.	SAMHL. PR.	EINST.	KENNI-NR.	STIG	BL	LENGD AFTUR-FÓTA	ÞYNGD
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							

	Styrkur	Með- höndlun nr.	Samhliða prófun nr.	Númer einstaklings	Kennimerki einstaklings	Þroskun- arstig	Lengd frá snoppu að þarfagangi (mm)	Lengd afturfóta (mm)	Blautvigt allrar lífverunnar (mg)
RÖÐ	MEDH.	MEDH. NR.	SAMHL. PR.	EINST.	KENNI- NR.	STIG	BL	LENGD AFTUR- FÓTA	ÞYNGD
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							

	Styrkur	Með- höndlun nr.	Samhliða prófun nr.	Númer einstaklings	Kennimerki einstaklings	Þroskun- arstig	Lengd frá snoppu að þarfagangi (mm)	Lengd afturfóta (mm)	Blautvigt allrar lífverunnar (mg)
RÖÐ	MEDH.	MEDH. NR.	SAMHL. PR.	EINST.	KENNI- NR.	STIG	BL	LENGD AFTUR- FÓTA	ÞYNGD
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							

	Styrkur	Með- höndlun nr.	Samhliða prófun nr.	Númer einstaklings	Kennimerki einstaklings	Þroskun- arstig	Lengd frá snoppu að þarfagangi (mm)	Lengd afturfóta (mm)	Blautvigt allrar lífverunnar (mg)
RÖÐ	MEDH.	MEDH. NR.	SAMHL. PR.	EINST.	KENNI- NR.	STIG	BL	LENGD AFTUR- FÓTA	ÞYNGD
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							

Tafla 3

Útreiknuð samantekt á endapunkturagögnum frá 7. og 21. degi

MEDH.	SAMHL. PR.	Þroskunarstig			Lengd frá snoppu að þarfagangi (mm)		Lengd afturfóta (mm)		Þyngd (mg)	
		LÁG-MARK	MÍÐ-GILDI	HÁMARK	MEDAL-TAL	STAÐAL-FRÁVIK	MEDAL-TAL	STAÐAL-FRÁVIK	MEDAL-TAL	STAÐAL-FRÁVIK
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!

Note: Dálkaútreikningar tengjast gagnafærslum í töflu 2.

Tafla 4

Gögn um dagleg afföll

Prófunardagur	Dagsetning	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Gildi!																
2	#Gildi!																
3	#Gildi!																
4	#Gildi!																
5	#Gildi!																
6	#Gildi!																
7	#Gildi!																
8	#Gildi!																
9	#Gildi!																
10	#Gildi!																
11	#Gildi!																
12	#Gildi!																
13	#Gildi!																
14	#Gildi!																
15	#Gildi!																
16	#Gildi!																
17	#Gildi!																
18	#Gildi!																
19	#Gildi!																
20	#Gildi!																
21	#Gildi!																
Fjöldi samliða prófana		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fjöldi meðhöndlana		0				0				0				0			

Athugasemd: Dálkaútreikningar tengjast gagnafærslum í töflu 1.

		Efnahéiti:																			
		CAS-nr.:																			
Prófunardagur	Dagsetning	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Gildi!																				
7	#Gildi!																				
8	#Gildi!																				
9	#Gildi!																				
10	#Gildi!																				
11	#Gildi!																				
12	#Gildi!																				
13	#Gildi!																				
14	#Gildi!																				
15	#Gildi!																				
16	#Gildi!																				
17	#Gildi!																				
18	#Gildi!																				
19	#Gildi!																				
20	#Gildi!																				
21	#Gildi!																				

Athugasemd: Dálkaútreikningar tengjast gagnafærslum í töflu 1.

Tafla 7

Vefjameinafræðilegar skýrslugjafartölur fyrir kjarnaviðmiðanir

Dagsetning:

Íðefni:

Meinafræðingur:

Kenninr. dýrs, samanburður — samhlöa prófun 1	Kenninr. dýrs, samanburður — samhlöa prófun 2	Íðefni:			
		Ofstækkun skjaldkirtils	Rýrnun skjaldkirtils	Frumuofstækkun í skjaldkirtilsbúi	Frumuofvöxtur í skjaldkirtilsbúi
Samtals:					

Kenninr. dýrs, skammtur —samhlöa prófun 1	Kenninr. dýrs, skammtur —samhlöa prófun 2	Meinafræðingur:			
		Ofstækkun skjaldkirtils	Rýrnun skjaldkirtils	Frumuofstækkun í skjaldkirtilsbúi	Frumuofvöxtur í skjaldkirtilsbúi
Samtals:					

Kenninr. dýrs, skammtur — samhlöa prófun 1	Kenninr. dýrs, skammtur — samhlöa prófun 2	Íðefni:			
		Ofstækkun skjaldkirtils	Rýrnun skjaldkirtils	Frumuofstækkun í skjaldkirtilsbúi	Frumuofvöxtur í skjaldkirtilsbúi
Samtals:					

Kenninr. dýrs, skammtur — samhlöa prófun 1	Kenninr. dýrs, skammtur — samhlöa prófun 2	Meinafræðingur:			
		Ofstækkun skjaldkirtils	Rýrnun skjaldkirtils	Frumuofstækkun í skjaldkirtilsbúi	Frumuofvöxtur í skjaldkirtilsbúi
Samtals:					

Tafla 8

Vefjameinafræðilegar viðbótarviðmiðanir

Dagsetning:

Íðefni:

Meinafræðingur:

Kenninr. dýrs, skammtur —samhlíða prófun 1	Kenninr. dýrs, skammtur —samhlíða prófun 2	Stækkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi	
		Mínkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi	Mínkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi
Samtals:			

Kenninr. dýrs, skammtur —samhlíða prófun 1	Kenninr. dýrs, skammtur —samhlíða prófun 2	Stækkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi	
		Mínkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi	Mínkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi
Samtals:			

Kenninr. dýrs, skammtur —samhlíða prófun 1	Kenninr. dýrs, skammtur —samhlíða prófun 2	Stækkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi	
		Mínkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi	Mínkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi
Samtals:			

Kenninr. dýrs, skammtur —samhlíða prófun 1	Kenninr. dýrs, skammtur —samhlíða prófun 2	Stækkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi	
		Mínkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi	Mínkun holsvæðis í skjaldkirtilsbúi
Samtals:			

Tafla 9

Lýsing í samfelldu máli á vefjameinafræðilegum niðurstöðum

Dagsetning:

Íðefni:

Meinafræðingur:

Lýsing í samfelldu máli

Kenninir. dýrs, samamburður — samhlíða prófún 1		
Kenninir. dýrs, samamburður — samhlíða prófún 2		
Kenninir. dýrs, skammtur — samhlíða prófún 1		
Kenninir. dýrs, skammtur — samhlíða prófún 2		

Kenninir, dýrs, skammtur — samhlíða prófun 1		
Kenninir, dýrs, skammtur — samhlíða prófun 2		
Kenninir, dýrs, skammtur — samhlíða prófun 1		
Kenninir, dýrs, skammtur — samhlíða prófun 2		

3. viðbætur

Aðrar greiningar á þyngd og lengd ef meira en 20% af halakörtum fara á síðari stig þroskunar við einn styrkleika eða fleiri

Ef aukinn fjöldi halakarta sýna þroskun sem er ofan við 60. stig ($\geq 20\%$) í einum nafnstyrkleika eða fleiri skal gera tveggja þátta dreifnigreiningu með stigskiptri dreifniskipan á öllum halakörtum til að meta áhrif á vöxt vegna meðhöndlunar með íðefnum en taka um leið tillit til áhrifa af þroskun á síðara stigi á vöxt.

Lagt er til að nota öll gögnin en taka tillit til áhrifa af þroskun á síðara stigi. Þetta er hægt að gera með tveggja þátta dreifnigreiningu með stigskiptri dreifniskipan. Skilgreina skal SíðaraStig = „já“ fyrir dýr ef þroskunarstig þess er 61. stig eða hærra. Að öðrum kosti skal skilgreina SíðaraStig = „nei“. Síðan er hægt að gera tveggja þátta dreifnigreiningu með styrk og SíðaraStigi og víxlverkun þeirra, með „samhl. pr.(styrkur)“ sem handahófskenndan þátt og „halakarta(samhl. pr.)“ sem annan handahófskenndan þátt. Þarna er samhlíða prófunin ennþá meðhöndluð sem einingin til greiningar og gefur í aðalatriðum sömu niðurstöður og vegin greining á meðaltali „samhl. pr.*SíðaraStig“, vegið með fjölda dýra á hvert meðaltal. Ef gögnin uppfylla ekki kröfur dreifnigreiningar um normleika eða einsleitni dreifni er hægt að gera staðlaða röðunarvörpun (e. *rank-order transform*) til að fjarlægja hindrunina.

Til viðbótar við stöðluð F-próf dreifnigreiningar á áhrif af styrk, SíðaraStigi og víxlverkun þeirra er hægt að „sneiða“ víxlverkunar F-prófið í tvö F-próf dreifnigreiningar til viðbótar, annað fyrir meðalsvaranir fyrir alla styrkleika fyrir SíðaraStig „nei“ og hitt fyrir meðalsvaranir fyrir alla styrkleika fyrir SíðaraStig „já“. Frekari samanburður á meðaltali meðhöndlana á móti samanburðarprófun er gerður fyrir hvert stig SíðaraStigs. Hægt er að gera leitnigreiningu með því að nota víðeigandi andstæður eða hægt er að gera einfaldan parasamanburð ef fyrir hendi eru vísbendingar um skammtasvörun sem er ekki einhalla innan stigs SíðaraStigs breytu. Bonferroni-Holm-aðlögun á p-gildum er einungis gerð ef samsvarandi F-sneið er ekki marktæk. Þetta er hægt að gera með SAS og að öllum líkindum með öðrum tölfræðihugbúnaðarpökkum. Vandkvæði geta komið upp vegna þess að það eru engin dýr á síðara stigi í sumum styrkleikanna en hægt er að bregðast við þeim aðstæðum á einfaldan hátt.

4. viðbætur

Skilgreiningar

Íðefni: Efni eða blanda.

Prófunariðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

C.39. ÆXLUNARPRÓFUN Á STÖKKMORI Í JARÐVEGI

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 232 um prófanir (2009). Þessi prófunaraðferð er ætluð til að meta áhrif íðefna á viðkomu stökkmors í jarðvegi. Hún byggir á fyrirbyggjandi aðferðum (1. og 2. heimild). *Folsomia candida*, sem fjölgar sér með meyfæðingu, og *Folsomia fimetaria*, sem fjölgar sér með kynæxlun, eru tvær af aðgengilegustu tegundum stökkmors og þær eru ræktanlegar og fást á almennum markaði. Þegar meta þarf sérstök búsvæði, sem þessar tvær tegundir lifa ekki á, má beita þessari aðferð einnig á aðrar tegundir stökkmors, ef þær uppfylla gildisviðmiðanir um prófunina.
2. Jarðvegsstökkmor hefur vistfræðilega þýðingu í visteitufnafræðilegum prófunum. Stökkmor er sexfætla með þunna ytri stoðgrind, sem hleypir auðveldlega gegnum sig lofti og vatni, og er dæmi um liðýrategund sem hefur aðra íkomuleið og annað váhrifahlutfall samanborið við ánamaðka og pottorma.
3. Þéttleiki stökkmors nær venjulega 10^5m^{-2} í jarðvegi og feyrulögum úr laufi í mörgum landvistkerfum (3. og 4. heimild). Fullvaxin dýr mælast yfirleitt 0,5–5 mm að lengd og er framlag þeirra til heildarlífsmassa dýra og heildaröndunar jarðvegs lítið og er áætlað á bilinu 1–5% (5. heimild). Mikilvægasta hlutverk þess gæti því falist í hugsanlegri stillingu vistferla með því að nærast á örverum og örfánu. Stökkmor er bráð fjölmargra hryggleysingja sem lifa í og á efstu lögum jarðvegs, eins og mítla, hundraðfætla, kóngulóa, smiðsbjalla og jötunuxa. Stökkmor tekur þátt í niðurbrotsferlum í súrur jarðvegi þar sem það kann að vera mikilvægasti jarðvegshryggleysinginn, fyrir utan pottorma, þar eð ánamaðkar og þúsundfætlur fyrirfinnst yfirleitt ekki þar.
4. *F. fimetaria* finnst um allan heim og er algeng í nokkrum jarðvegstegundum allt frá sendnum til myldins jarðvegs og frá mikið til lítið rotins mójarðvegs (e. *mull to mor soils*). Þetta stökkmor er án augna og litarefna. Það hefur fundist í nytjajarðvegi um alla Evrópu (6. heimild). Það er alæta og nærir m.a. á sveppbráðum, bakteríum, frumdýrum og feyru. Með beit getur *F. fimetaria* verkað á sýkingu af völdum sveppa, sem valda sjúkdómum hjá plöntum (7. heimild), og getur haft áhrif á svepprótt, en vitað er að *F. candida* hefur sömu áhrif. Það fjölgar sér með kynæxlun, líkt og flestar tegundir stökkmors, og þarf stöðuga viðveru karldýrs til frjóvunar á eggjum.
5. *F. candida* finnst einnig um allan heim. Þó að tegundin sé ekki algeng í flestum náttúrulegum jarðvegum þá finnst hún oft í miklum fjölda á svæðum sem eru rík af moldarefni. Þetta stökkmor er án augna og litarefna. Halaförkur (stökkliðfæri) þess er vel þroskaður og eins hlaupahreyfingarnar og það er snögg að stökkva þegar það verður fyrir truflun. Vistfræðilegt hlutverk *F. candida* er svipað hlutverki *F. fimetaria*, en búsvæðin eru frekar jarðvegir sem er ríkir af lífrænum efnum. Tegundin fjölgar sér með meyfæðingu. Karldýr geta verið færri en eitt á hvert þúsund dýra.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

6. Samstillt fullvaxin dýr (*F. fimetaria*) eða ungvíði (*F. candida*) stökkmors eru látin verða fyrir váhrifum af röð styrkleika af prófunariðefni sem er blandað í breytan tilbúinn jarðveg (8. heimild), þar sem innihaldið er 5% lífrænt efni (eða annar jarðvegur). Hægt er að skipta sviðsmynd prófunarinnar í tvö þrep:
 - Skammtastærðarrannsókn, ef nægar upplýsingar um eiturrhif eru ekki fyrirbyggjandi, en þar eru dánartíðni og æxlan helstu endapunkturarnir sem eru metnir eftir tvær vikur fyrir *F. fimetaria* og eftir þrjár vikur fyrir *F. candida*.
 - Endanleg æxlunarprófun þar sem heildarfjöldi ungvíðis undaneldisdýranna og lifun undaneldisdýranna eru metin. Tímalengd endanlegu prófunarinnar er þrjár vikur fyrir *F. fimetaria* og fjórar vikur fyrir *F. candida*.

Eiturrhif prófunariðefnisins á dánartíðni fullvaxinna dýra og viðkomu eru gefin upp sem LC_x og EC_x , með því að setja gögnin upp í viðeigandi líkan með ólínulegu aðhvarfi, til að meta styrkinn sem veldur $x\%$ dánartíðni eða minnkun í viðkomu, eftir því sem við á, eða sem gildi styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif/styrks sem hefur merkjanleg áhrif (9. heimild).

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍDEFNIÐ

7. Æskilegt er að eðlisrænir eiginleikar, vatnsleysni, $\log K_{ow}$, deilistuðull milli jarðvegs og vatns og gufuþrýstingur fyrir prófunarídefnið séu þekkt. Viðbótarupplýsingar um afdrif prófunarídefnisins í jarðveginum, s.s. hraði ljósrofs og vatnsrofs og lífræns niðurbrots, eru æskilegar. Skjalfesta skal efnafræðilega samngreiningu á prófunarídefninu samkvæmt flokkunarkerfi Alþjóðasamtaka um hreina og hagnýta efnafræði, CAS-númer, framleiðslulotu, lotu, byggingarformúlu og hreinleika, ef þau eru tiltæk.
8. Hægt er að nota þessa prófunaraðferð fyrir vatnsleysanleg eða óleysanleg ídefni. Þó mun ísetning prófunarídefnisins verða mismunandi til samræmis við það. Prófunaraðferðin á ekki við fyrir rokgjörn ídefni, þ.e. ídefni þar sem fasti samkvæmt Henry og/eða deilistuðull lofts/vatns er hærri en einn, eða ídefni þar sem gufuþrýstingur fer yfir 0,0133 Pa við 25 °C.

GILDI PRÓFUNARINNAR

9. Samanburðarprófanir án meðhöndlunar skulu uppfylla eftirfarandi viðmiðanir til að prófunarniðurstaða sé talin gild:
 - Meðaldánartíðni fullvaxinna dýra skal ekki að fara yfir 20% við lok prófunarinnar.
 - Meðalfjöldi ungvíðis í hverju íláti skal að vera a.m.k. 100 við lok prófunarinnar.
 - Frávíksstuðull sem reiknaður er fyrir fjölda ungvíðis skal vera minni en 30% við lok endanlegu prófunarinnar.

VIÐMIÐUNARÍDEFNI

10. Prófa skal viðmiðunariðefni við styrkinn EC₅₀ fyrir jarðvegsgerðina sem valin er til prófunar, annað hvort með reglulegu millibili eða hugsanlega bæta því í hverja prófunarkeyrslu til að staðfesta að svörum prófunarlifveranna í prófunarkerfinu sé innan eðlilegra marka. Bórsýra er hentugt viðmiðunariðefni sem ætti að lækka æxlun um 50% hjá báðum tegundum (10. og 11. heimild) við u.þ.b. 100 mg/kg af þurrvígt jarðvegs.

LÝSING Á PRÓFUNINNI

Prófunarílát og búnaður

11. Ílát sem taka 30 g af rökum jarðvegi eru hentug prófunarílát. Þau skulu vera annað hvort úr gleri eða hvarftregu plasti (óeitruðu). Forðast skal þó að nota plastílát ef váhrif prófunarídefnisins minnka vegna sögs. Þversniðsflatarmál prófunarílata skal vera þannig að raunveruleg dýpt jarðvegs í prófunarílatinu verði 2–4 cm. Ílátin skulu vera með lok (t.d. úr gleri eða pólýetýleni) sem eru hönnuð til að draga úr vatnsuppgufun jafnframt því að gefa kost á loftskiptum milli jarðvegs og andrúmslofts. Ílátið skal vera a.m.k. að hluta til gagnsætt til að hleypa birtu í gegn.
12. Nota þarf venjulegan rannsóknarstofubúnað, einkum eftirfarandi:
 - þurrskáp,
 - víðsjá,
 - sýrustigsmæli og ljósmæli,
 - hentugar, nákvæmar vogir,
 - fullnægjandi búnað til hitastýringar,
 - fullnægjandi búnað til loftrakastýringar (ekki nauðsynlegt ef váhrifaílátunum er lokað með loki),
 - hitastýrðan hitakassa eða lítið herbergi,
 - töng eða loftstreymisbúnað með litlum sogkrafti.

Tilreiðsla prófunarjarðvegs

13. Notaður er breyttur tilbúinn jarðvegur (8. heimild) þar sem innihaldið er 5% lífrænt efni. Að öðrum kosti er hægt að nota náttúrulegan jarðveg, þegar tilbúni jarðvegurinn líkist ekki náttúrulegum jarðvegi. Tillögð samsetning tilbúins jarðvegs er eftirfarandi (byggt á þurrvig, þurrkað í stöðuga þyngd við 105 °C):

- 5% mosamór, loftþurrkaður og finmalaður (kornastærð 2 ± 1 mm er ásættanleg),
- 20% kaólinleir (kaóliníttinnihald helst yfir 30%),
- u.þ.b. 74% loftþurrkaður iðnaðarsandur (fer eftir því magni kalsíumkarbónats sem þörf er á, aðallega finn sandur með yfir 50% af ögnum á bilinu 50 til 200 míkron. Nákvæmt magn sands fer eftir magni kalsíumkarbónats (sjá að neðan), til samans skal það að vera 75%.
- 1,0% kalsíumkarbónat (CaCO_3 , malað í duft, greiningarhreinleiki) til að ná pH-gildi $6,0 \pm 0,5$; magn kalsíumkarbónats sem bætt er við ræðst e.t.v. fyrst og fremst af gæðum/eðli mósins (sjá 1. athugasemd).

1. *athugasemd:* Magn CaCO_3 sem nauðsynlegt er fer eftir efnisþáttum jarðvegsundirlagsins og skal ákvarðað með því að mæla sýrustig forræktaðra, rakra undirsýna úr jarðveginum rétt áður en prófunin er gerð.

2. *athugasemd:* Mælt er með því að mæla sýrustigið og jafnvel hlutfall kolefnis og köfnunarefnis (C/N), plúsónaskiptagetu og innihald lífræns efnis í jarðvegi til að leyfa jöfnun síðar meir og til að geta túlkað niðurstöðurnar betur.

3. *athugasemd:* Ef þörf krefur, t.d. vegna tiltekins tilgangs með prófun, getur náttúrulegur jarðvegur frá ómengduðum stöðum einnig gegnt hlutverki prófunar- og/eða ræktunarundirlags. Ef náttúrulegur jarðvegur er notaður skal þó lýsa eiginleikum þess, a.m.k. eftir uppruna (söfnunarstað), sýrustigi, kornastærð (dreifingu kornastærðar), plúsónaskiptagetu og innihaldi lífræns efnis og hann skal vera laus við alla mengun. Að því er varðar náttúrulegan jarðveg þá er ráðlegt að sýna fram á hentugleika hans fyrir prófun og til að ná gildisviðmiðunum prófunarinnar áður en jarðvegurinn er notaður í endanlega prófun.

14. Þurrinnihaldsefnum jarðvegsins er blandað vel saman (t.d. í stórum rannsóknarstofublandara). Hámarksvatnsheldni tilbúna jarðvegsins er ákvörðuð í samræmi við verkferlana sem er lýst í 5. viðbæti. Rakainnihald prófunarjarðvegs skal bestað til að jarðvegsbyggingin verði laus og gropin svo að stökkmori komist inn í gropurnar. Það er yfirleitt á bilinu 40–60% af hámarksvatnsheldni.
15. Tveimur til sjö dögum áður en prófunin hefst er þurri, tilbúni jarðvegurinn forrakabættur með því að bæta við hann nægilega miklu af afjönuðu vatni, til að ná u.þ.b. helmingnum af endanlegu vatnsinnihaldi, til að jafnvægisstilla/stöðga sýrustigið. Til að ákvarða sýrustig er notuð blanda af jarðvegi og 1 M kalíumklóríðlausn (KCl) eða 0,01 M kalsíumklóríðlausn (CaCl_2) í hlutfallinu 1:5 (skv. 6. viðbæti). Ef jarðvegurinn er súrari en tilskilið styrkbil er hægt að stilla hann með því að bæta við viðeigandi magni af kalsíumkarbónati. Ef jarðvegurinn er of basískur er hægt að stilla hann með því að bæta við ólífrænni sýru sem skaðar ekki stökkmor.
16. Forrakabætta jarðveginum er skipt í hluta sem samsvara fjölda prófunarstyrkleika (og viðmiðunaríðefni, eftir því sem við á) og samanburða sem eru notaðir í prófunina. Prófunaríðefnunum er bætt við og vatnsinnihaldi er stýrt skv. 24. lið.

Val og undirbúningur á tilraunadýrum

17. Tegundin sem mælt er með er *F. candida*, sem fjölgar sér með meyfæðingu, þar eð þessi tegund uppfyllti gildisviðmiðanirnar fyrir lifun oftast en *F. fimetaria* í hringprófuninni á prófunaraðferðinni (11. heimild). Ef notuð er önnur tegund skal hún uppfylla gildisviðmiðanir sem lýst er í 9. lið. Við upphaf prófunarinnar skulu dýrin vera vel nærð og á aldrinum 23–26 daga fyrir *F. fimetaria* og 9–12 daga fyrir *F. candida*. Í hverri samhliða prófun skal fjöldi *F. fimetaria* vera 10 karldýr og 10 kvendýr, en fyrir *F. candida* skal nota 10 kvendýr (sjá 2. viðbæti og 3. viðbæti). Samstilltu dýrin skulu valin af handahófi úr skálunum og athuga skal heilsu og líkamlegt ástand þeirra fyrir hverja lotu sem bætt er við í samhliða prófun. Hver hópur með 10/20 dýrum er settur í prófunarílát sem valið er af handahófi og velja skal stóru kvendýrin af tegundinni *F. fimetaria* til að tryggja að auðvelt sé að greina þær frá karldýrunum af tegundinni *F. fimetaria*.

Tilreiðsla prófunarstyrkleikanna

18. Hægt er að nota fjórar aðferðir við ísetningu prófunariðefnisins: 1) blöndun prófunariðefnis í jarðveginn með vatn sem burðarefni, 2) blöndun prófunariðefnis í jarðveginn með lífrænan leysi sem burðarefni, 3) blöndun prófunariðefnis í jarðveginn með sand sem burðarefni, eða 4) prófunariðefnið borið á jarðvegsyfirborðið. Val á viðeigandi aðferð fer eftir eiginleikum íðefnisins og tilgangi prófunarinnar. Almennt séð er mælt með því að blanda prófunariðefninu í jarðveginn. Þó getur reynst þörf á að nota aðferðir við ísetningu sem eru í samræmi við hagnýta notkun prófunariðefnisins (t.d. að úða fljótandi samsetningu eða nota sérstakar varnarefnasamsetningar, s.s. korn eða fræmeðhöndlun). Jarðvegurinn er meðhöndlaður áður en stökkmor er sett í hann, nema þegar prófunariðefnið er borið á jarðvegsyfirborðið, en þá skal leyfa stökkmori að fara inn í jarðveginn fyrir meðhöndlun.

Prófunariðefni sem er leysanlegt í vatni

19. Lausn prófunariðefnisins er tilreidd í afjönuðu vatni í magni sem nægir fyrir allar samhliða prófanir með einum prófunarstyrk. Hverri lausn prófunariðefnisins er blandað vandlega við einn skammt af forrakabættum jarðvegi áður en hann er settur í prófunarílátíð.

Prófunariðefni sem er óleysanlegt í vatni

20. Að því er varðar íðefni sem eru óleysanleg í vatni en leysanleg í lífrænum leysum er hægt að leysa prófunariðefnið upp í minnsta mögulega magni af hentugum leysi (t.d. asetoni), en tryggja þó rétta blöndun íðefnisins í jarðveginn og blanda því með þeim hluta af kvarssandi sem krafist er. Einungis skal nota rokgjarna leysa. Þegar lífrænn leysir er notaður skulu allir prófunarstyrkleikar og neikvætt samburðarsýni til viðbótar með leysi innihalda sama lágmarksmagn leysisins. Skilja skal notkunarlát eftir opin í tiltekinn tíma til að leysirinn, sem tengist notkun prófunariðefnisins, geti gufað upp, og tryggja að eitruða íðefnið dreifist ekki á þessum tíma.

Prófunariðefni sem er torleysanlegt í vatni og lífrænum leysum

21. Að því er varðar íðefni sem eru torleysanleg í vatni og lífrænum leysum er kvarssandur, sem skal vera hluti af heildarsandinum sem bætt er í jarðveginn, blandaður með magninu af prófunariðefninu til að fá tilætlaðan prófunarstyrk. Þessari blöndu af kvarssandi og prófunariðefni er bætt í forrakabættan jarðveg og blandað vandlega saman eftir að viðeigandi magni af afjönuðu vatni er bætt við til að fá það rakainnihald sem þörf er á. Lokablöndunni er skipt á milli prófunarílátanna. Aðferðin er endurtekin fyrir hvern prófunarstyrk og viðeigandi samburður er einnig tilreiddur.

Prófunariðefnið borið á jarðvegsyfirborðið

22. Ef prófunariðefnið er varnarefni getur verið við hæfi að úða því á jarðvegsyfirborðið. Jarðvegurinn er meðhöndlaður eftir að stökkmor er sett í hann. Fyrst eru prófunarílátin fyllt með röku jarðvegsundirlagi, þá er dýrunum komið fyrir og síðan eru prófunarílátin vigtuð. Til að koma í veg fyrir að dýrin verði fyrir beinum váhrifum frá prófunariðefninu með beinni snertingu er prófunariðefninu bætt við a.m.k. hálfri klukkustund eftir að stökkmori er komið fyrir. Bera skal prófunariðefnið eins jafnt og unnt er á jarðvegsyfirborðið með því að nota hentugt úðunartæki af rannsóknarstofustærð til að líkja eftir úðun á akri. Bera skal efnið á við hitastig innan frávíks ± 2 °C, og að því er varðar vatnslausnir, ýrulausnir eða dreifilausnir með vatnssetningarhraða samkvæmt ráðleggingum í áhættumati. Hraðinn skal sannprófaður með viðeigandi kvörðunartækni. Hægt er að nota sérstakar samsetningar, s.s. korn eða fræmeðhöndlun, í samræmi við notkun í landbúnaði. Fóðri er bætt við eftir úðun.

VERKFERLI**Prófunarskilyrði**

23. Meðalhitastig í prófuninni skal vera 20 ± 1 °C með hitasvið á bilinu 20 ± 2 °C. Prófunin er framkvæmd við stýrða birtu- og myrkvunarhringrás (helst 12 klst. birta og 12 klst. myrkur) og lýsingu sem nemur 400 til 800 lúxum hjá prófunarílátunum

24. Ílátin eru vegin í upphafi prófunarinnar, til að kanna rakastig jarðvegsins, og um miðbik og við endi prófunarinnar. Þyngdartap > 2% er bætt upp með því að bæta við afjönuðu vatni. Hafa skal í huga að hægt er að draga úr vatnstapi með því að viðhalda háu loftrastigi (> 80%) í prófunarræktunarkassanum.
25. Mæla skal sýrustig við upphaf og lok skammtastærðarrannsóknarinnar og endanlegu prófunarinnar. Mælingar skulu gerðar í einu samanburðarjarðvegssýni til viðbótar og einu sýni til viðbótar af meðhöndluðu jarðvegs-sýnunum (allir styrkleikar) sem eru tilreidd og viðhaldið á sama hátt og prófunarræktirnar en án þess að bæta stökkmori við.

Prófunaraðferð og mælingar

26. Að því er varðar hvern prófunarstyrk er prófunarjarðvegur, sem að magni svarar til 30 g votvigtar, settur í prófunarílát. Vatnssamanburður án prófunariðefnis er einnig tilreiddur. Ef notað er burðarefni við ísetningu prófunariðefnisins skal keyra eina samanburðarröð sem inniheldur eingöngu burðarefnið til viðbótar við prófanaraðirnar. Styrkur leysisins eða dreifefnisins skal vera sá sami og er notaður í prófunarílátunum með prófunariðefninu.
27. Stökkmorið er sett varlega, hvert fyrir sig, í hvert prófunarílát (dýrin eru sett af handahófi í prófunarílatin) ofan á jarðveginn. Hægt er að nota loftstreymisbúnað með litlum sogkrafti til að tryggja árangursríkan flutning dýranna. Fjöldi samhliða prófana fyrir prófunarstyrkleikana og fjöldi samanburðarhópa ræðst af tilhögun prófunar sem er notuð. Prófunarílátunum er raðað af handahófi í prófunarræktunarkassann og röðuninni breytt af handahófi í hverri viku.
28. Í prófun á *F. fimetaria* skal nota tuttugu fullvaxin dýr, 10 karldýr og 10 kvendýr, 23–26 daga gömul, á hvert prófunarílát. Á 21. degi er stökkmorið tekið úr jarðveginum og talið. Að því er varðar *F. fimetaria* eru kynin aðgreind eftir stærð í samstilltum dýrahóp sem notaður er í prófuninni. Kvendýr eru greinilega stærri en karldýr (sjá 3. viðbæti).
29. Í prófun á *F. candida* skal nota 9–12 daga gamalt ungvíði, 10 dýr, á hvert prófunarílát. Á 28. degi er stökkmorið tekið úr jarðveginum og talið.
30. Heppilegur fôðurgjafi samanstendur af nægilegu magni, t.d. 2–10 mg, af kornuðu, þurrkuðu brauðgeri, sem er fánlegt á almennum markaði til heimilisnota, sem er bætt við í hvert ílát við upphaf prófunarinnar og aftur eftir u.þ.b. tvær vikur.
31. Við lok prófunarinnar er dánartíðni og æxlun metin. Stökkmorið er tekið úr prófunarjarðveginum eftir þrjár vikur (*F. fimetaria*) eða fjórar vikur (*F. candida*) (sjá 4. viðbæti) og talið (12. heimild). Stökkmor er skráð dautt ef það finnst ekki við töku. Aðferðir við töku og talningu skulu vera fullgiltar. Fullgildingin felur í sér skilvirki í töku ungvíðis sem er meiri en 95%, t.d. með því að bæta þekktum fjölda við jarðveg.
32. Gagnlegri samantekt og tímaáætlun prófunarferlisins er lýst í 2. viðbæti.

Tilhögun prófunar

Skammtastærðarrannsókn

33. Ef nauðsyn krefur er framkvæmd skammtastærðarrannsókn, t.d. með fimm styrkleikum prófunariðefnis sem nema 0,1, 1,0, 10, 100 og 100 mg/kg þurrvigt jarðvegs og tvær samhliða prófanir fyrir hverja meðhöndlun og samanburðarprófun. Viðbótarupplýsingar úr prófunum með svipuðum íðefnum eða úr heimildum um dánartíðni eða æxlun stökkmors geta einnig verið gagnlegar við ákvörðun styrks sem nota skal í skammtastærðarrannsókninni.
34. Tímalengd skammtastærðarrannsóknarinnar er tvær vikur fyrir *F. fimetaria* og þrjár vikur fyrir *F. candida* til að tryggja að hópur af ungvíði hafi orðið til. Við lok prófunarinnar er dánartíðni og æxlun stökkmorsins metin. Skrá skal fjölda fullvaxinna dýra og hvort ungvíði er fyrir hendi.

Endanleg prófun

35. Til að ákvarða EC_x (t.d. EC_{10} , EC_{50}) skal prófa tólf styrkleika. Mælt er með a.m.k. tveimur samhliða prófunum fyrir hverja meðhöndlun prófunarstyrks og sex samhliða samanburðarprófunum. Bilstuðullinn getur verið breytilegur með hliðsjón af skammtasvörunarmynstri.
36. Til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif skal prófa a.m.k. fimm styrkleika í jafnhlutfallaröð. Mælt er með fjórum samhliða prófunum fyrir hverja meðhöndlun prófunarstyrks ásamt átta samanburðarprófunum. Munurinn á styrkleikum skal nema stuðli sem fer ekki yfir 1,8.
37. Samsett aðferð gerir það kleift að ákvarða bæði styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og EC_x . Nota skal átta meðhöndlunarstyrkleika í jafnhlutfallaröð í þessari samsettu aðferð. Mælt er með fjórum samhliða prófunum fyrir hvern meðhöndlunarhóp ásamt átta samanburðarhópum. Munurinn á styrkleikum skal nema stuðli sem fer ekki yfir 1,8.
38. Ef engin áhrif eru merkjanleg við hæsta styrk í skammtastærðaprófun (þ.e. 1000 mg/kg), er hægt að framkvæma æxlunarprófun sem markprófun og nota prófunarstyrkinn 1000 mg/kg og samanburðarprófunina. Markprófun gefur færi á að sýna fram á við markstyrkinn séu engin tölfraðilega marktæk áhrif. Nota skal átta samhliða prófanir, bæði fyrir meðhöndlaða jarðveginn og samanburðinn.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

39. Helsti endapunktur er viðkoma (t.d. fjöldi ungvíðis sem verður til í hverju prófunariláti). Í tölfraðilegri greiningu, t.d. með dreifnigreiningaraðferðum, eru meðhöndlunarleiðir bornar saman með t-prófi, Dunnetts-prófun eða Williams-prófun. Reiknuð eru 95% öryggisbil fyrir hvert meðaltal meðferðarprófana.
40. Fjöldi fullvaxinna dýra sem lifir af í ómeðhöndluðum samanburðarprófunum er mikilvæg gildisviðmiðunarforsenda og skal skjalfestur. Eins og í skammtastærðarrannsókninni skal einnig skrá öll skaðleg einkenni í lokaskýrslunni.

 LC_x og EC_x

41. EC_x -gildi fyrir breytur, þ.m.t. tilheyrandi efri og lægri 95% öryggismörk, eru reiknuð út með viðeigandi tölfraðiaðferðum (t.d. umhverfðri jöfnu eða Weibull-jöfnu, klipptri Spearman-Kärber-aðferðinni eða einföldum innreikningi). EC_x fæst með því að setja gildi, sem samsvarar x% af meðaltali samanburðarins, inn í jöfnuna sem fæst. Til að reikna út EC_{50} eða annan EC_x skulu fullnaðargögnin sett í aðvarfsgreiningu. LC_{50} er yfirleitt áætlað með probit-greiningu eða svipaðri greiningu þar sem tekið er tillit til gagna um dánartíðni sem hafa tvíhliða dreifingu.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsta styrkur sem hefur merkjanleg áhrif

42. Ef tölfraðilegri greiningu er ætlað að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif er nauðsynlegt að nota tölfraðilegar upplýsingar um hvert ílát (litið er á hvert stöku ílátanna sem samhliða prófun). Nota skal viðeigandi tölfraðiaðferðir samkvæmt skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 54 um gildandi nálganir við tölfraðilega greiningu gagna um visteiturhrif. Leiðbeiningar fyrir notkun (e. *OECD Document 54 on the Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*) (9. heimild). Skaðleg áhrif prófunaríðefnisins samanborið við samanburðarprófunina eru yfirleitt rannsókuð með því að nota einhliða tilgátuprófun við $p \leq 0,05$.
43. Hægt er að prófa normaldreifingu og einsleitni dreifni með því að nota hentuga tölfraðilega prófun, t.d. Shapiro-Wilk-prófun og Levene-prófun, eftir því sem við á ($p \leq 0,05$). Hægt er að framkvæma einhliða dreifnigreiningu (ANOVA) og síðan margfaldar samanburðarprófanir. Hægt er að nota margþættan samanburð (t.d. próf Dunnetts) eða leitni-prófun með stíglækkun (t.d. Williams-prófun) til að reikna út hvort það er marktækur munur ($p \leq 0,05$) á milli samanburðar og hinna ýmsu styrkleika prófunaríðefnisins (val á tillagðri prófun samkvæmt skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 54 (9. heimild)). Að öðrum kosti er hægt að nota stikalausar aðferðir (t.d. Bonferroni-U-próf samkvæmt Holm eða Jonckheere-Terpstra-leitni-prófun) til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif og minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif.

Markprófun

44. Ef markprófun (samanburður á einungis einu samanburðarlíati og meðhöndlunarlíati) hefur verið framkvæmd og forsendur stikabundinna prófunaraðferða (normleiki, einsleitni) eru uppfylltar er hægt að meta mælanlegar svaranir með t-prófi. Nota má t-prófun fyrir ójafna dreifni (Welch) eða stikalaus prófun, s.s. Mann-Whitney-U-prófun, ef þessar kröfur eru ekki uppfylltar.
45. Til að ákvarða umtalsverðan mun milli samanburðarláta (samanburður og samanburður með leysi) er hægt að prófa ílát samhliða prófunar fyrir hverja samanburðarprófun eins og lýst er fyrir markprófunina. Ef ekki greinist umtalsverður munur í þessum prófunum er hægt að hópa öll ílát með samanburðarprófun og ílát samhliða samanburðarprófana með leysi. Að öðrum kosti skal bera öll meðhöndlunarílat saman við samanburðinn sem er með leysi.

Prófunarskýrsla

46. Í prófunarskýrslunni skulu a.m.k. vera eftirtaldar upplýsingar:

Prófunariðefni

- auðkenni prófunariðefnisins, lotu- og CAS-númer, hreinleiki,
- eðlisefnafræðilegir eiginleikar prófunariðefnisins (t.d. log Kow, vatnsleysni, gufuþrýstingur, fasti samkvæmt Henry (H) og helst upplýsingar um afdrif prófunariðefnisins í jarðveginum), ef það liggur fyrir,
- tilgreina skal samsetningu prófunariðefnisins og aukefnanna ef hreina íðefnið er ekki prófað.

Prófunarlífverur

- auðkenning tegunda og birgjar prófunarlífvera, lýsing á ræktunarskilyrðum og aldursbil lífvera.

Prófunarskilyrði

- lýsing á tilhögun tilraunar og verkferli,
- upplýsingar um tilreiðslu prófunarjarðvegs, ítarleg lýsing ef náttúrulegur jarðvegur er notaður (uppruni, saga, dreifing kornastærðar, sýrustig, innihald lífræns efnis),
- vatnsheldni jarðvegsins,
- lýsing á aðferðinni sem notuð var til að koma prófunariðefninu í jarðveginn,
- prófunarskilyrði: ljósstyrkur, lengd birtu- og myrkvunarhringrásar, hitastig,
- lýsing á fæðunarfyrikomulaginu, tegund og magn fæðurs sem notað er í prófuninni, fæðunardagar,
- sýrustig og vatnsinnihald jarðvegsins við upphaf og lok prófunarinnar (samanburðarprófun og sérhver meðhöndlunarprófun),
- nákvæm lýsing á aðferð við töku og skilvirkni í töku,

Niðurstöður úr prófun

- fjöldi ungvíðis sem er ákvarðaður í hverju prófunarlíati við lok prófunar,
- fjöldi fullvaxinna dýra og dánartíðni þeirra (%) í hverju prófunarlíati við lok prófunar,
- lýsing á augljósum lífeðlisfræðilegum eða meinafræðilegum einkennum eða greinilegum breytingum á atferli,
- niðurstöður sem fást með viðmiðunarprófunariðefninu,
- gildi fyrir styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif, LC_x fyrir dánartíðni og EC_x fyrir æxlun (aðallega LC_{50} , LC_{10} , EC_{50} og EC_{10}) ásamt 95% öryggisbilum. Línurit aðlagða líkansins sem er notað við útreikningana, falljafna þess og stíkar (sjá 9. heimild),

- allar upplýsingar og athuganir sem koma að gagni við túlkun niðurstaðna,
- styrkur raunverulegrar prófunar ef tilgátuprófun er gerð (9. heimild),
- frávik frá þeim verkferlum sem lýst er í þessari prófunaraðferð og öll óvenjuleg tilvik meðan prófunin stendur yfir,
- gildi prófunarinnar,
- minnsti greinanlegi munur þegar styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif er áætlaður.

HEIMILDIR

- 1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- 2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneva
- 3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London
- 4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388
- 5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. *Acta Zoologica Fennica* 195: 111-118
- 6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)
- 7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268
- 8) Kaffli C.36 í þessum viðauka, *Ránmitill (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) æxlunarprófun í jarðvegi*.
- 9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris
- 10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.
- 11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.
- 12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. *Appl. Soil Ecol.* 7, 201-205
- 13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.
- 14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In *Soil Zoology* (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416
- 15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomologists' Monthly Magazine* 96:138-140.

*I. viðbætur***Skilgreiningar**

Eftirfarandi skilgreiningar eiga við um þessa prófunaraðferð (í þessari prófun er allur hrifstyrkur gefinn upp sem massi prófunariðefnis á þurrmassa prófunarjarðvegs):

Íðefni er efni eða blanda.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif er styrkur prófunariðefnis þar sem engin áhrif eru merkjanleg. Í þessari prófun hefur styrkur, sem svarar til styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif, engin tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif er minnsti styrkur prófunariðefnis sem hefur tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun.

EC_x (styrkur sem hefur x% áhrif) er sá styrkur sem hefur x% áhrif á prófunarlífverur innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun. Til dæmis er EC₅₀ sá styrkur sem metið er að hafi, við prófunarendapunkt, áhrif á 50% af þýði sem er látið verða fyrir váhrifum yfir tilgreint váhrifatímabil.

Prófunariðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófað með þessari prófunaraðferð.

2. viðbætur

Helstu aðgerðir og tímaáætlun fyrir framkvæmd prófunar á stökkmori

Hægt er að taka saman þrepin í prófuninni sem hér segir:

Tími (dagur)	Aðgerð
-23 til -26	Tilreiðsla samstilltrar ræktunar <i>F. fimetaria</i> .
-14	Tilreiðsla tilbúins jarðvegs (blöndun á þurrum innihaldsefnum). Athuga skal sýrustigi tilbúins jarðvegs og stilla til samræmis við það Mæling á hámarksvatnsheldni jarðvegs
-9 til -12	Tilreiðsla samstilltrar ræktunar <i>F. candida</i>
-2 til -7	Forrakabæting jarðvegs
-1	Skipting ungvíðis í hópa Tilreiðsla stofnlausna og ísetning prófunariðefnis ef þörf er á leysi
0	Tilreiðsla stofnlausna og ísetning prófunariðefnis ef það er í föstu formi, vatnsleysanlegt eða borið á yfirborðið, sé þess þörf. Mæling á sýrustigi jarðvegs og vigtnun fláta. Fóðri bætt við. Ísetning stökkmors.
14	Skammtastærðarrannsókn á <i>F. fimetaria</i> : Prófun stöðvuð, dýrin tekin, mæling á sýrustigi jarðvegs og vatnstapi (vigt) Endanlegar prófanir: Mæling á rakainnihaldi, vatni bætt við og bætt við 2–10 mg af geri
21	Endanleg prófun á <i>F. fimetaria</i> : Prófun stöðvuð, dýrin tekin, mæling á sýrustigi jarðvegs og vatnstapi (vigt) Skammtastærðarrannsókn á <i>F. candida</i> : Prófun stöðvuð, dýrin tekin, mæling á sýrustigi jarðvegs og vatnstapi (vigt)
28	Endanleg prófun á <i>F. candida</i> : Prófun stöðvuð, dýrin tekin, mæling á sýrustigi jarðvegs og vatnstapi (vigt)

3. viðbætur

Leiðbeiningar um eldi og samstillingu *F. fimetaria* og *F. candida*

Athuga skal tíma og tímalengd sem eru gefin í þessum leiðbeiningum fyrir hvern tiltekinn stofn stökkmors til að tryggja að tímasetningin gefi kost á fullnægjandi fjölda samstillts ungvíðis. Í grundvallaratriðum er það eggvarp, eftir að fullvöxnu dýrin hafa verið færð á nýtt undirlag, og klak sem ákvarða hvaða dagur hentar til eggjatöku og töku samstillts ungvíðis.

Mælt er með því að koma á varanlegri stofnrækt sem samanstendur af t.d. 50 ílátum/ræktunarskálum. Stofnræktin skal geymd við góða fôðrun þar sem dýrin eru fôðruð vikulega, þeim brynnt og gamalt fôður og hræ eru fjarlægð. Ef of fá dýr eru á undirlaginu getur það leitt til hömlunar vegna meiri sveppavaxtar. Ef stofnræktin er notuð of oft til eggjaframleiðslu getur komið þreyta í hana. Merki um þreytu eru dauð fullvaxin dýr og mygla á undirlaginu. Hægt er að nota þau egg sem eftir eru af framleiðslu samstilltu dýra til að endurnýja ræktina.

Í samstilltri rækt *F. fimetaria* eru karldýr aðgreind frá kvendýrum aðallega eftir stærð. Karldýr eru greinilega smærri en kvendýr og gönguhraði karldýra er meiri en kvendýra. Rétt val á kyni krefst lítillar æfingar og er hægt að staðfesta með smásjárannsókn á æxlunarfærasvæðinu (13. heimild).

1. Eldi

1.a Tilreiðsla ræktunarundirlags

Ræktunarundirlag er gifsefni (kalsíumsúlfat) með virku viðarkoli. Það gefur rakt undirlag og viðarkolið gegnir því hlutverki að gleypa úrgangslöft og úrgangsefni (14. og 15. heimild). Nota má ólík form viðarkols til að auðvelda að gera athaganir á stökkmori. Til dæmis er viðarkol í duftformi notað fyrir *F. candida* og *F. fimetaria* (myndar svart/ grátt gifsefni):

Innihaldsefni undirlags:

- 20 ml af virku viðarkoli
- 200 ml af eimuðu vatni
- 200 ml af gifsefni

eða

- 50 g af virku viðarkoli, möluðu í duft
- 260–300 ml af eimuðu vatni
- 400 g af gifsefni.

Undirlagsblandan er látin setjast fyrir notkun.

1.b Undaneldi

Stökkmor er geymt í ílátum s.s. ræktunarskálum (90 mm × 13 mm), þar sem botninn er þakinn 0,5 cm þykku undirlagi úr gifsefni/viðarkoli. Dýrin eru ræktuð við 20 ± 1 °C við birtu- og myrkvunarhringrás með 12 klst. birtu og 12 klst. myrkur (400–800 lúx). Ílátum er ávallt haldið rökum til að tryggja að rakastig loftsins í ílátunum sé 100%. Þetta er hægt að tryggja með rennandi vatni í grofna gifsefninu en forðast skal að vatnhúð myndist á yfirborði gifsefnisins. Hægt er að koma í veg fyrir vatnstap með því að halda andrúmslofti röku. Fjarlægja skal öll dauð dýr úr ílátunum, sem og myglað fôður. Til að örva eggjaframleiðslu er nauðsynlegt að færa fullvaxin dýr í ræktunarskálur með nýlögðu undirlagi úr gifsefni/viðarkoli.

1.c Fóðurgjafi

Kornað, þurrkað brauðger er eina fóðrið sem er notað fyrir bæði *F. candida* og *F. fimetaria*. Nýtt fóður er gefið einu sinni eða tvisvar í viku til að forðast myndun myglu. Það er sett beint á gifsefnið í litilli hrúgu. Laga skal magn brauðgers að stærð stökkmorstofnsins, en almenna reglan er sú að 2–15 mg er nægilegt.

2. Samstilling

Prófunin skal fara fram á samstilltum dýrum til að fá einsleit tilraunadýr á sama stigi og af sömu stærð. Auk þess gerir samstillingin kleift að greina á milli karl- og kvendýra *F. fimetaria* frá þriggja vikna aldri, á grundvelli kynbundinnar tvíbreytni (e. *sexual dimorphism*), þ.e. stærðarmunar. Aðferðin hér fyrir neðan er tillaga að því hvernig er hægt að fá samstillt dýr (verklega aðferðin er valfrjáls).

2.a Samstilling

- Ílát með 0,5 cm þykku undirlagi úr gifsefni/viðarkoli er undirbúið.
- Fyrir eggjavarp skal færa 150–200 fullvaxin *F. fimetaria* og 50–100 *F. candida* úr bestu 15–20 ílátunum með stofnræktinni með 4–8 vikna gömlu undirlagi yfir í nýju ílátin og gefa þeim 15 mg af brauðgeri. Forðast skal að leiða ungvíði og fullvaxin dýr saman, þar eð ungvíðið getur hamlað eggjaframleiðslu.
- Geymið ræktunina við 20 ± 1 °C (meðalhiti skal vera 20 °C) og við birtu- og myrkvunarhringrás með 12 klst. birtu og 12 klst. myrkur (400–800 lúx). Tryggja skal að nýtt fóður sé tiltækt og loftið sé mettað af vatni. Fóðurskortur getur leitt til þess að dýrin losa hægðir á eggjum, sem leiðir til sveppavaxtar á eggjunum, eða *F. candida* getur farið að éta eigin egg. Eftir 10 daga eru eggin tekin varlega með nál og spaða og færð á „eggjapappír“ (litla búta af síupappír, sem hefur verið dýft í fljótandi gifsefni/viðarkoli) sem er settur í ílát með nýju undirlagi úr gifsefni/viðarkoli. Nokkrum kornum af geri er bætt við undirlagið til að laða að ungvíði til að það yfirgefi eggjapappírinn. Mikilvægt er að eggjapappírinn og undirlagið séu rök, annars þorna eggin upp. Að öðrum kosti má fjarlægja fullvöxnu dýrin úr samstillingarræktinni eftir að þau hafa framleitt egg í 2–3 daga.
- Eftir þrjú daga hafa flest eggin á eggjapappírnum klakist út og finna má ungvíði undir eggjapappírnum.
- Til að fá ungvíði á svipuðum aldri er eggjapappír með eggjum sem ekki hafa klakist út fjarlægður úr ræktunarskálinni með töng. Ungvíðið sem er núna 0–3 daga gamalt verður eftir í skálinni og er því gefið brauðger. Eggjum sem ekki hafa klakist út er fleygt.
- Egg og klakið ungvíði eru ræktuð á sama hátt og fullvöxnu dýrin. Gera skal eftirfarandi ráðstafanir, einkum varðandi *F. fimetaria*: tryggja skal nægilegt ferskt fóður, fjarlægja skal gamalt fóður sem er farið að mygla, eftir eina viku er ungvíðinu skipt í nýjar ræktunarskálur að því tilskildu að þéttni þeirra er yfir 200.

2.b Meðhöndlun stökkmors við upphaf prófunar

- Teknar eru 9–12 daga gamlar *F. candida* eða 23–26 daga gamlar *F. fimetaria* t.d. með sögi og settar í lítið ílát með röku undirlagi úr gifsefni/viðarkoli og líkamlegt ástand þeirra er kannað undir tvisæissmásjá (meidd og sködduð dýr eru fjarlægð). Framkvæma skal öll þrepin á meðan stökkmori er haldið í röku andrúmslofti til að koma í veg fyrir álag vegna þurrka, t.d. með því að nota bleytt undirlag o.s.frv.
- Ílátinu er snúið á hvolf og bankað á það til að færa stökkmorið á jarðveginn. Hlutleysa skal stöðurafmagn því annars gætu dýrin flogið upp í loft eða límst við hlið prófunarílátsins og þornað upp. Til hlutleysingar má nota tæki til jónunar eða setja rakan klút undir ílátið.
- Dreifa skal fóðrinu yfir allt yfirborð jarðvegsins, ekki aðeins í eina hrúgu.

- Á meðan á flutningi og prófunartímabili stendur skal forðast að banka í prófunarilátin eða valda truflunum á annan hátt, þar eð slíkt getur aukið þjöppun jarðvegsins og truflað samskipti dýranna.

3. Staðgöngutegundir stökkmors

Velja má aðrar tegundir stökkmors fyrir prófun samkvæmt þessari prófunaraðferð, s.s. *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Uppfylla þarf fjölda forsendna áður en staðgöngutegundir eru notaðar:

- Þær skulu vera sanngreinanlegar með ótvíræðum hætti.
 - Færa skal rök fyrir vali á tegundinni.
 - Tryggja skal að líffræði æxlunarinnar sé felld inn í prófunarfasann svo að hún verði fyrir mögulegum áhrifum á meðan váhrifum stendur.
 - Lífsferill skal vera þekktur: aldur við kynþroska, tímalengd eggjaþroskunar og lírfustig sem verða fyrir váhrifum.
 - Prófunarundirlag og fôðurframboð skal veita kjörskilyrði fyrir vöxt og æxlun.
 - Breytileiki skal vera nægilega lítill fyrir nákvæmt mat á eiturrifum.
-

*4. viðbætur***Taka og talning dýra****1. Hægt er að nota tvær aðferðir við töku.**

- 1.a Fyrri aðferð: Hægt er að nota búnað með stýrðum hitastigli, sem byggir á meginreglum MacFadyens (1. heimild). Hitald sem er staðsett efst á íláti, sem dýrunum er komið fyrir eftir töku, gefur frá sér hita (stýrist af hitanema sem staðsettur er á yfirborði jarðvegssýnisins). Hitastiginu í kælda vökvanum sem umlykur söfnunarílátíð er stýrt með hitanema sem er staðsettur á yfirborði söfnunarílátsins (undir jarðvegssýni). Hitanemarnir eru tengdir við forritanlega stýrieiningu sem hækkar hitastigið samkvæmt fyrirfram ákveðinni áætlun. Dýrunum er safnað saman í kælda söfnunarílátinu (2 °C) með undirlagi úr gifsefni/viðarkoli. Byrjað er að taka dýrin við 25 °C og hitastigið hækkar sjálfvirkt um 5 °C á 12 klst. fresti og varir í 48 klst. Eftir 12 klst. við 40 °C er töku dýra lokið.
- 1.b Seinni aðferð: Að loknum ræktunartíma í tilraunaskyni er fjöldi ungvíðis stökkmors metinn með floti. Í því skyni er prófunin framkvæmd í ílátum sem eru u.þ.b. 250 ml að rúmmáli. Við lok prófunarinnar er u.þ.b. 200 ml af eimuðu vatni bætt við. Hrært er varlega í jarðveginum með finnum pensli til að stökkmorið fljóti upp á vatnsyfirborðið. Bæta má litlu magni, u.þ.b. 0,5 ml, af svörtum Kentmere leysilit fyrir ljósmyndir út í vatnið til að auðvelda talningu með því að auka andstæður milli vatns og hvíta stökkmorsins. Leysiliturinn er ekki eittraður fyrir stökkmori.

2. Talning:

Telja má eftir auganu eða undir ljósmásjá þar sem grind er yfir flotílátíð, eða með því að taka ljósmynd af yfirborði í hverju íláti og telja síðan stökkmorið á stækkuðum útprentunum eða skygnum. Einnig má telja með því að nota stafrænar myndvinnsluáðferðir (12. heimild). Allar aðferðir skulu vera fullgildar.

5. viðbætur

Ákvörðun á hámarksvatnsheldni jarðvegsins

Eftirfarandi aðferð við ákvörðun á hámarksvatnsheldni jarðvegs hefur reynst hentug. Henni er lýst í viðauka C við ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction (23. heimild)).

Tilgreindu magni (t.d. 5 g) af prófunarjarðvegsundirlagi er safnað með hentugu sýnatökuáhalði (kjarnabor o.s.frv.). Síupappír eru settur fyrir botninn á rörinu og það síðan sett á stand í vatnsbaði. Rörið skal smám saman fært í kaf þar til vatnshæðin er ofan við hæð jarðvegsins. Það skal síðan skilið eftir í vatninu í u.þ.b. þrjár klst. Þar eð vatnið sem hárpípur í jarðveginum draga í sig situr ekki allt eftir skal láta hripa úr jarðvegssýninu í tvær klst. með því að setja rörið á beð með mjög blautum, fínmuldum kvarssandi í lokuðu ílátí (til að koma í veg fyrir þornun). Síðan skal þurrka sýnið þar til það hefur náð stöðugum massa við 105 °C og vega það. Þá skal reikna út vatnsheldni eftir því sem hér segir:

$$\text{Vatnsheldni (í \% af þurrmassa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Þar sem:

S = vatnsmettað undirlag + massi rörs + massi síupappírs

T = tara (massi rörs + massi síupappírs)

D = þurrmassi undirlags

*6. viðbætur***Ákvörðun á sýrustigi jarðvegs**

Eftirfarandi aðferð við að ákvarða sýrustig jarðvegs byggist á lýsingu í ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (16. heimild).

Tilgreint magn af jarðvegi er þurrkað við stofuhita í a.m.k. 12 klst. Síðan er tilreidd sviflausn með jarðveginum (inniheldur a.m.k. 5 g af jarðvegi) sem nemur fimmföldu rúmmáli af annað hvort 1 M lausn af kalíumklóríði af greiningarhreinleika eða 0,01 M lausn af kalsíumklóríði af greiningarhreinleika (CaCl_2). Sviflausnin er síðan hrist rækilega í fimm mínútur og síðan látin setjast í a.m.k. 2 klst. en ekki lengur en 24 klst. Síðan er sýrustig fljótandi fasans mælt með sýrustigsmæli sem hefur verið kvarðaður fyrir hverja mælingu með viðeigandi röð jafnalausna (t.d. pH-gildi 4,0 og 7,0).

C.40. PRÓFUN Á EITURHRIFUM Á LÍFSFERLI MÝFLUGULIRFA Í SETI OG VATNI MEÐ NOTKUN Á ÍBÆTTU VATNI EÐA ÍBÆTTU SETI

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 233 um prófanir (2010). Hún er ætluð til að meta áhrif af ævilöngum váhrifum iðefna á tvívængjur, sem búa í ferskvatni, af tegundinni *Chironomus* sp. og nær að fullu yfir fyrstu kynslóð (P-kynslóð) og fyrri hluta annarrar kynslóðar (F1-kynslóðar). Hún er rýmkun á fyrirliggjandi prófunaraðferðum, C.28 (1. heimild) eða C.27 (15. heimild), þar sem notuð er sviðsmynd af váhrifum með íbættu vatni eða íbættu seti, eftir því sem við á. Þar er tekið tillit til fyrirliggjandi aðferðarlýsinga fyrir eiturrhifaprófanir á *Chironomus riparius* og *Chironomus dilutus* (sem áður hét *C. tentans* (2. heimild)) sem voru þróaðar í Evrópu og Norður-Ameríku (3.–9. heimild) og síðan hringprófaðar (1., 7. og 10.–12. heimild). Einnig er heimilt að nota aðrar tegundir mýflugulirfa sem hafa verið mikið rannsakaðar, t.d. *Chironomus yoshimatsui* (13.–14. heimild). Heildarváhrifatími er u.þ.b. 44 dagar fyrir *C. riparius* og *C. yoshimatsui* og u.þ.b. 100 dagar fyrir *C. dilutus*.
2. Sviðsmyndum af váhrifum með vatni og seti er lýst í þessari prófunaraðferð. Val á viðeigandi sviðsmynd af váhrifum fer eftir fyrirhugaðri notkun á prófuninni. Sviðsmynd af váhrifum á vatni, með íbætingu í vatnssúluna, er ætlað að líkja eftir úðareki varnarefnis og nær yfir upphafstoppgildi styrksins í yfirborðsvatni. Íbæting í vatni er einnig gagnleg fyrir annars konar váhrif (þ.m.t. iðefnaleka) en ekki fyrir uppsöfnunarferla í seti sem standa lengur en prófunartímabilið. Í slíkum tilvikum, og einnig þegar frárennsli er helsta íkomuleið varnarefna í vatnshlot, getur tilhögun með íbættu seti átt betur við. Auðvelt er að breyta tilhögun prófunarinnar ef aðrar sviðsmyndir af váhrifum eru til athugunar. Til greina getur komið að nota gerviset sem staðgengil (t.d. kvarssand) ef t.d. dreifing prófunariðefnisins milli vatnsfasans og setlagsins er ekki til athugunar og lágmarka þarf ásog í setið.
3. Íðefni sem þarf að prófa gagnvart lífverum sem búa í seti getur verið þrávirkt í seti í langan tíma. Lífverur sem búa í seti geta orðið fyrir váhrifum eftir mörgum leiðum. Hlutfallslegt mikilvægi hverrar váhrifaleiðar og sá tími sem það tekur fyrir hverja þeirra að stuðla að heildareiturrhifum er háð eðlisefnafræðilegum eiginleikum iðefnisins. Að því er varðar mjög ásogandi iðefni eða iðefni sem eru tengd setinu með samgildum tengjum getur inntaka á mengaðri fæðu verið mikilvæg váhrifaleið. Í því skyni að vanmeta ekki eiturrhif mjög fitusækinna iðefna getur komið til greina að bæta fæðu við setið áður en prófunariðefnið er sett í (sjá 31. lið). Því er hægt að taka með allar váhrifaleiðir og öll stig lífsferils.
4. Mældir endapunktur eru heildarfjöldi fullvaxinna flugna sem kviknuðu (bæði í fyrstu og annari kynslóð), hraði þroskunar (bæði í fyrstu og annari kynslóð), kynjahlutfall fullkviknaðra og lifandi fullvaxinna flugna (bæði í fyrstu og annari kynslóð), fjöldi eggjalengja (e. *egg rope*) á hvert kvendýr (aðeins í fyrstu kynslóð) og frjósemi eggjalengjanna (aðeins í fyrstu kynslóð).
5. Eindregið er mælt með samsettu seti. Samsett set hefur nokkra kosti fram yfir náttúrulegt set:
 - dregið er úr breytileika í tilraunum því það myndar samanburðarnákvæman „staðlaðan efnivið“ og ekki er þörf á að finna ómengið og hreina uppsprettu sets,
 - unnt er að hefja prófanir hvenær sem er án þess að upp komi árstíðabundinn breytileiki í prófunarsetinu og ekki er þörf á að formeðhöndla setið til að fjarlægja dýr sem eru upprunnin í því,
 - minni kostnaður í samanburði við söfnun á nægilegu magni á vettvangi sem þarf fyrir venjubundnar prófanir,
 - samsett set gerir það kleift að bera saman eiturrhif milli rannsókna og raða efnun til samræmis við það (3. heimild).
6. Skilgreiningar sem eru notaðar eru gefnar upp í 1. viðbæti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

7. Mýflugulirfur á fyrsta lirfustigi eru látar verða fyrir váhrifum af prófunaríðefni af mismunandi styrk í set- og vatnskerfum. Prófunin hefst á því að setja lirfur á fyrsta lirfustigi (fyrsta kynslóð) í bikarglós sem innihalda íbætt set eða þá að prófunaríðefnið er sett í vatnið eftir að lirfurnar eru settar í það. Kvikunarhraði mýflugulirfa, tíminn sem kviknunin tók og kynjahlutfall fullkviknaðra og lifandi mýflugna eru metin. Fullvaxnar flugur sem hafa kviknað eru fluttar í eldisbúr til að gera þeim kleift að sveima, parast og verpa eggjum. Fjöldi eggjalengja sem myndast og frjósemi þeirra eru metin. Úr þessum eggjalengjum fást lirfur af annarri kynslóð á fyrsta lirfustigi. Þessar lirfur eru settar í nýundirbúin bikarglós (sama íbætingaraðferð og fyrir fyrstu kynslóð) til að ákvarða lífvænleika annarrar kynslóðar með mati á kvikunarhraða þeirra, tímann sem kviknunin tók og kynjahlutfall fullkviknaðra og lifandi mýflugna (kerfisbundna framsetningu á lífsferilsprófuninni er að finna í 5. viðbæti). Öll gögn eru greind, annaðhvort með aðhvarfslíkani til að meta styrk sem veldur x% skerðingu á viðkomandi endapunkti eða með því að nota tilgátuprófun til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC). Það síðarnefnda krefst samanburðar á svörun við meðferð og viðeigandi svörun samanburðarprófana með notkun tölfræðilegra prófana. Ef um er að ræða íðefni sem brotna hratt niður ber að hafa í huga að í sviðsmyndinni með íbætta vatninu geta síðari stig lífsferlils hveir kynslóðar (t.d. púpustigið) orðið fyrir váhrifum við talsvert lægra styrkleikastig í yfirliggjandi vatninu en lirfur á fyrsta lirfustigi. Ef þetta veldur áhyggjum og þörf er á sambærilegu váhrifastigi fyrir hvert stig lífsferils geta eftirfarandi breytingar á prófunaraðferðinni komið til greina:

- samhliða prófanir með íbætingu á mismunandi stigum lífsferils, eða
- endurtekin íbæting (eða endurnýjun á yfirliggjandi vatni) í prófunarkerfinu í báðum áföngum prófunarinnar (fyrstu og annarri kynslóð), þar sem bilin milli íbætingar (endurnýjunar) skulu löguð að afdrifaeiginleikum prófunaríðefnisins.

Slíkar breytingar er aðeins hægt að gera í sviðsmyndinni með íbætta vatninu en ekki í sviðsmyndinni með íbætta setinu.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

8. Vatnsleysni prófunaríðefnisins, gufuþrýstingur þess og $\log K_{ow}$, mæld eða útreiknuð skipting í set og stöðugleiki í vatni og seti þurfa að vera þekkt. Fyrir skal liggja áreiðanleg aðferð til að magnákvæða prófunaríðefnið í yfirliggjandi vatni, gropuvatni og seti með þekktri og skráðri nákvæmni og þekktum greiningarmörkum. Meðal gagnlegra upplýsinga eru byggingarformúla og hreinleiki prófunaríðefnisins. Afdrif prófunaríðefnisins (t.d. eyðing, niðurbrot með og án tilstillis lífvera o.s.frv.) eru einnig gagnleg. Frekari leiðbeiningar um prófun á íðefnum sem hafa eðlisefnafræðilega eiginleika sem gerir erfitt um vik að framkvæma prófunina eru í 16. heimild.

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

9. Viðmiðunariðefni er hægt að prófa reglubundið til að tryggja að ekki hafi orðið breytingar á næmi rannsóknarstofustofna. Að því er varðar halaflær þá dugar að framkvæma 48 stunda rannsókn á bráðum eiturhrifum (skv. 17. heimild). Þar til fullgiltar leiðbeiningar fyrir brád eiturhrif eru aðgengilegar getur þó komið til greina að nota prófun á langvinnum áhrifum samkvæmt kafla C.28 í þessum viðauka. Dæmi um viðmiðunareiturefni sem eru notuð með góðum árangri í hringprófanir og fullgildingarrannsóknir eru: lindan, triflúralín, pentaklórfenól, kadmíumklóríð og kalíumklóríð. (1., 3., 6.–7. og 18. heimild).

GILDI PRÓFUNARINNAR

10. Prófunin gildir því aðeins að eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:
- meðalkviknunin í samanburðarprófuninni skal vera a.m.k. 70% við lok váhrifatímabilsins fyrir báðar kynslóðir (1. og 7. heimild),
 - að því er varðar *C. riparius* og *C. yoshimatsui* skulu 85% af heildarfjölda fullvaxinna mýflugna, sem hafa kviknað í samanburðarprófuninni í báðum kynslóðum, hafa kviknað á bilinu 12 til 23 dögum eftir að lirfur á fyrsta lirfustigi voru settar í ílátin; að því er varðar *C. dilutus* er tímabilið 20 til 65 dagar viðunandi,

- meðalkynjahlutfall fullkviknaðra og lifandi fullvaxinna flugna (hlutfall kvendýra og karldýra) í samanburðarprófuninni á báðum kynslóðum skal vera a.m.k. 0,4 en ekki fara yfir 0,6,
- fyrir hvert eldisbúr skal fjöldi eggjalengja í samanburðarprófunum á fyrstu kynslóð vera a.m.k. 0,6 á hvert kvendýr sem bætist í eldisbúrið,
- hluti frjorra eggjalengja í hverju eldisbúri í samanburðarprófunum á fyrstu kynslóð skal vera a.m.k. 0,6,
- við lok váhrifatímabilsins fyrir báðar kynslóðir skal mæla sýrustig og styrk uppleysts súrefnis í hverju íláti. Súrefnisstyrkurinn skal vera a.m.k. 60% af metnargildi lofts ⁽¹⁾ og pH-gildi yfirliggjandi vatns skal vera á bilinu 6–9 í öllum prófunarlátum,
- munurinn á vatnshitastiginu skal ekki vera meiri en $\pm 1,0$ °C.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Prófunarlát og eldisbúr

11. Lirfurnar eru láttnar verða fyrir váhrifum í 600 ml bikarglösum úr gleri sem eru ca 8,5 cm í þvermál (sjá 5. viðbæti). Önnur ílát eru hentug en tryggð skal að dýpt yfirliggjandi vatns og sets sé hæfileg. Yfirborð setsins skal vera nægilegt til að gefa 2 til 3 cm² fyrir hverja lirfu. Hlutfallið milli dýptar setlagsins og dýptar yfirliggjandi vatns skal vera u.þ.b. 1:4. Nota skal eldisbúr (B × H × D a.m.k. 30 cm) með grisju (mökstærð u.þ.b. 1 mm) að ofan og á a.m.k. einni hlið búrsins (sjá 5. viðbæti). Í hvert búr skal setja 2 l kristöllunarskál sem inniheldur prófunarvatn og set til að verpa eggjum í. Hlutfallið milli dýptar setlagsins og dýptar yfirliggjandi vatns skal einnig vera u.þ.b. 1:4 fyrir kristöllunarskálina. Eftir að eggjalengjum er safnað úr kristöllunarskálinni er þeim komið fyrir á 12 hola mikrótitrunarbakka (ein lengja í hverja holu sem inniheldur a.m.k. 2,5 ml af vatni úr íbættu kristöllunarskálinni) og eftir það eru bakkarnir settir undir lok til að koma í veg fyrir mikla uppgufun. Einnig er heimilt að nota önnur ílát sem henta fyrir eggjalengjur. Prófunarlát og annar búnaður, að undanskildum mikrótitrunarbökkunum, sem kemst í snertingu við prófunarkerfið, skulu eingöngu vera úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni (t.d. pólýtetraflúoretýleni).

Val á tegund

12. Í prófuninni skal helst nota tegundina *Chironomus riparius*. Einnig er heimilt að nota *C. yoshimatsui*. *C. dilutus* er einnig hentug tegund en erfiðari í meðhöndlun og hún krefst lengri prófunartíma. Upplýsingar um ræktunaraðferðir eru gefnar upp í 2. viðbæti fyrir *C. riparius*. Einnig eru upplýsingar um ræktunarskilyrði aðgengilegar fyrir *C. dilutus* (5. heimild) og *C. yoshimatsui* (14. heimild). Sanngreining á tegundunum skal staðfest fyrir prófun en hennar er ekki krafist fyrir hverja prófun ef lífverurnar koma úr innanhússræktun.

Set

13. Helst skal nota samsett set (einnig nefnt endurgert set, gerviset eða tilbúið set). Ef náttúrulegt set er notað skal þó lýsa eiginleikum þess (a.m.k. sýrustigi, lífrænu kolefnisinnihaldi, einnig er mælt með ákvörðun á öðrum mæliþáttum s.s. hlutfalli kolefnis og köfnunarefnis (C/N) og kornastærðarmælingum) og það skal vera laust við alla mengun og aðrar lífverur sem gætu keppt við mýflugulirfurnar eða étid þær. Einnig er mælt með því að setið sé undirbúið í sjö daga við prófunarskilyrði fyrir prófunina. Mælt er með eftirfarandi samsettu seti eins og lýst er í 1. heimild (1. og 20.–21. heimild):
 - a) 4–5% (þurrvgit) mór: eins nálægt pH-gildinu 5,5 til 6,0 og mögulegt er; mikilvægt er að nota mó í duftformi, finmalaðan (kornastærð ≤ 1 mm) og einungis loftþurrkaðan,
 - b) 20% (þurrvgit) kaólinleir (kaólinítinnihald helst yfir 30%),

⁽¹⁾ Við 20 °C við staðlaðan loftþrýsting er metnargildi lofts í ferskvatni jafnt 9,1 mg/l (60% jafngildir 5,46 mg/l)

- c) 75–76% (þurrvig) kvarssandur (mest skal vera af finum sandi þar sem yfir 50% af ögnunum er á bilinu 50–200 µm),
 - d) afjónuðu vatni er bætt við til að ná raka lokablöndunnar á bilinu 30–50%,
 - e) kalsíumkarbónati af efnafræðilegum hreinleika (CaCO_3) er bætt við til að stilla pH-gildið í lokablöndu setsins í $7,0 \pm 0,5$,
 - f) lífrænt kolefnainnihald lokablöndunnar skal vera 2% ($\pm 0,5\%$) og hún skal stillt með því að nota viðeigandi magn af mó og sandi, í samræmi við a- og c-lið.
14. Uppspretta mós, kaólinleirs og sands skal þekkt. Athuga skal efnisþætti setsins til að ganga úr skugga um að efnamengun sé ekki fyrir hendi (t.d. þungmálmur, lífræn klórsambönd, lífræn fosfórsambönd). Dæmi um tilreiðslu á samsettu seti er lýst í 3. viðbæti. Blöndun á þurrum innihaldsefnum er einnig ásætlanleg ef sýnt er fram á að innihaldsefnin í setinu skilji sig ekki eftir að yfirleggjandi vatni er bætt við (t.d. fljótandi móagnir) og að mórinn eða setið sé nægilega undirbúið.

Vatn

15. Allt vatn, sem er í samræmi við efnafræðilega eiginleika hentugs þynningarvatns, eins og tilgreint er í 2. og 4. viðbæti, hentar sem prófunarvatn. Allt hentugt vatn, náttúrulegt vatn (yfirborðsvatn eða grunnvatn), endurgert vatn (sjá 2. viðbæti) eða afklórað kranavatn hentar sem ræktunarvatn og prófunarvatn ef mýflugulirfur geta lifað í því meðan á ræktun og prófun stendur án þess að sýna merki um streitu. Við upphaf prófunarinnar skal pH-gildi prófunarvatnsins vera á bilinu 6–9 og heildarharka ekki yfir 400 mg/l sem CaCO_3 . Ef grunur leikur á vixlverkun milli jóna sem valda hörku og prófunariðefnis skal þó nota vatn með minni hörku (af þessum sökum skal ekki nota Elendt-Medium M4 við þessar aðstæður). Nota skal sömu vatnstegundina í allri rannsókninni. Mæla skal gæðaeiginleika vatnsins, sem eru tilgreindir í 4. viðbæti, a.m.k. tvisvar á ári eða ef grunur leikur á að þessir eiginleikar kunni að hafa breyst verulega.

Stofnlausnir — Íbætt vatn

16. a. Prófunarstyrkur er reiknaður út á grundvelli styrks í vatnssúlunni, þ.e. í vatninu sem liggur yfir setinu. Prófunarlausnir af þeim styrk, sem valinn er hverju sinni, fást yfirleitt með því að þynna stofnlausn. Æskilegast er að tilreiða stofnlausnir með því að leysa prófunariðefnið upp í prófunarvatninu. Í tilteknum tilvikum kann að vera nauðsynlegt að nota leysa eða dreifiefni til að fá stofnlausn af hæfilegum styrkleika. Dæmi um heppilega leysa eru asetón, etýlenglýkólmonóetýleter, etýlenglýkóldímetyleter, dímetylformamíð og trietýlenglýkól. Leyfileg dreifiefni eru Cremophor RH40, Tween 80, 0,01% metýlsellulósi og HCO-40. Styrkur uppleysandi efnisins í endanlega prófunarmiðlinum skal vera lágmarksstyrkur (þ.e. $\leq 0,1$ ml/l) og vera sá sami í öllum meðhöndlunum. Ef uppleysandi efni er notað skal það ekki hafa marktæk áhrif á lifun en það skal kannað með samanburðarprófun með leysi í samanburði við neikvæða samanburðarprófun (með vatni). Þó skal forðast notkun slíkra efna í lengstu lög.

Stofnlausnir — Íbætt set

16. b. Íbætt set af þeim styrk sem valinn er eru yfirleitt tilreidd með því að bæta lausn af prófunariðefninu beint í setið. Stofnlausn prófunariðefnisins, sem er uppleyst í afjónuðu vatni, er blandað við samsetta setið með veltikvörn, fódurblandara eða handvirkt. Ef prófunariðefnið er torleysanlegt í vatni er hægt að leysa það upp í eins smáum skömmtum og unnt er í hentugum, lífrænum leysi (t.d. hexani, asetóni eða klóróformi). Síðan er þessi lausn blönduð með 10 g af finum kvarssandi í hvert prófunarilát. Leysirinn er látinn gufa upp og skal fjarlægja hann algjörlega úr sandinum; síðan er sandurinn blandaður með hæfilegu magni af seti. Einungis er hægt að nota efni sem gufa auðveldlega upp til að leysa prófunariðefnið upp, dreifa því

eða ýra. Hafa skal í huga að taka skal tillit til sandsins sem er að finna í prófunariðefninu og sandblöndunni við tilreiðslu á setinu (þ.e. af þeim sökum skal nota minni sand við tilreiðslu á setinu). Þess skal gætt að tryggja að prófunariðefninu, sem er bætt við setið, sé dreift vandlega og jafnt í setið. Ef nauðsyn krefur er hægt að greina undirsýni til að ákvarða einsleitni þess.

TILHÖGUN PRÓFUNAR

17. Tilhögun prófunar tengist því að velja styrk prófana, fjölda þeirra og styrkbil, fjölda íláta við hvern styrk, fjölda lirfa í hvert ílát, fjölda kristöllumarskála og eldisbúra. Tilhögun fyrir EC_x, styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) og markprófun er lýst hér á eftir.

Tilhögun að því er varðar aðhvarfsgreiningu

18. Prófunin skal ná yfir hrifstyrkinn (EC_x) og styrkviðið sem verið er að kanna m.t.t. áhrifa prófunariðefnisins þannig að endapunkturinn verði ekki framreiknaður umfram ramma gagnanna sem fást. Forðast skal að framreikna langt undir lægsta eða yfir hæsta styrk. Við val á hæfilegu prófunarstyrkbili getur verið gagnlegt að nota skammtastærðarprófun til bráðabirgða samkvæmt prófunaraðferðum C.27 eða C.28.
19. Að því er varðar aðferð fyrir EC_x er þörf á a.m.k. fimm styrkleikum og átta samhlíða prófunum fyrir hvern styrkleika. Fyrir hvern styrkleika skal nota tvö eldisbúr (A og B). Samhlíða prófununum átta er skipt í tvo hópa með fjórum samhlíða prófunum fyrir hvort eldisbúr. Þessi samruni samhlíða prófana er nauðsynlegur vegna þess fjölda mýflugna sem þarf í búið til að tryggja áreiðanlegt mat á æxlun. Á annarri kynslóð verða þó samhlíða prófanirnar aftur átta talsins, sem hefjast á þeim hópum sem verða fyrir váhrifum í eldisbúrunum. Stuðullinn milli styrkleika skal ekki vera hærri en tveir (hægt er að gera undantekningar í tilvikum þar sem hallatala skammtasvörunarferilsins er lág). Unnt er að fækka samhlíða prófunum í sex (þrjár fyrir hvort eldisbúr) við hverja meðhöndlun ef fjöldi prófunarstyrkleika með mismunandi svörum er aukinn. Ef fjöldi samhlíða prófana er aukinn eða bilið milli prófunarstyrkleika minnkað hefur það tilhneigingu til að leiða til þrengra öryggisbils fyrir EC_x.

Tilhögun við mat á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif

20. Að því er varðar aðferð fyrir styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif skal nota fimm prófunarstyrkleika með a.m.k. átta samhlíða prófunum (fjórum fyrir hvort búr, A og B) og stuðullinn milli styrkleikanna skal ekki vera hærri en tveir. Fjöldi samhlíða prófana skal nægja til að tryggja viðunandi tölfræðilegan styrk til að greina 20% mun miðað við samanburðinn við 5% marktæknistig ($\alpha = 0,05$). Að því er varðar hraða þroskunar, frjósemismátt og frjósemi er yfirleitt við hæfi að nota dreifnigreiningu, með Dunnetts-prófun eða Williams-prófun í kjölfarið (22.–25. heimild). Að því er varðar kvikunarhlutfall og kynjahlutfall getur verið við hæfi að nota Cochran-Armitage-prófun, nákvæmniprófun Fishers (með Bonferroni-leiðréttingu) eða Mantel-Haenszel-prófun.

Markprófun

21. Framkvæma má markprófun (einn prófunarstyrkur og samanburður) ef engin áhrif greinast við valkvæða skammtastærðarprófun til bráðabirgða upp að hámarksstyrk. Tilgangurinn með markprófuninni er að gefa til kynna að öll eiturrhif prófunariðefnisins séu að finna við hærri mörk en styrkleikamörkin sem prófuð eru. Mælt er með 100 mg/l fyrir vatn og 1000 mg/kg (þurrvigt) fyrir set. Alla jafna er nauðsynlegt að gera a.m.k. átta samhlíða prófanir, bæði fyrir meðhöndlunar- og samanburðarhópana. Sýna skal fram á viðunandi tölfræðilegan styrk til að greina 20% mun miðað við samanburðinn við 5% marktæknistig ($\alpha = 0,05$). Ef svaranir eru mælanlegar (t.d. hraði þroskunar) er t-prófun hentug tölfræðiaðferð ef gögnin uppfylla kröfurnar fyrir þessa prófun (normleiki, einsleit dreifni). Nota má t-prófun fyrir ójafna dreifni eða stikalaus prófun, s.s. Wilcoxon-Mann-Whitney-prófun, ef þessar kröfur eru ekki uppfylltar. Að því er varðar kvikunarhlutfall er nákvæmniprófun Fishers viðeigandi.

VERKFERLI

Váhrifaskilyrði

Tilreiðsla á vatns- og setkerfi (ibæting í vatn)

22. a. Samsettu seti (sjá 13.–14. lið og 3. viðbæti) er bætt í hvert prófunarílát og kristöllunarskál til að mynda a.m.k. 1,5 cm þykkt lag (má vera nokkuð þynnra í kristöllunarskálinni) en að hámarki 3 cm. Vatni (sjá 15. lið) er bætt við þannig að hlutfallið milli dýptar setlagsins og dýptar vatnsins verði ekki meira en 1:4. Að lokinni tilreiðslu á prófunarílátunum skal set- og vatnskerfið loftað varlega í u.þ.b. sjö daga áður en lirfum á fyrsta lirfustigi af fyrstu eða annarri kynslóð er bætt í (sjá 14. lið og 3. viðbæti). Set- og vatnskerfið í kristöllunarskálunum er ekki loftað meðan á prófuninni stendur þar eð ekki er þörf á að tryggja lifun lirfa (eggjalengjunum hefur þegar verið safnað saman fyrir klak). Til að komast hjá því að innihaldsefni setsins skiljist í sundur eða fingert efni þyrlist aftur upp meðan prófunarvatninu er bætt í vatnssúluna er hægt að hylja setið með plastskífu meðan vatni er hellt á það. Skífan er fjarlægð strax þar á eftir. Annar útbúnaður kann einnig að vera við hæfi.

Tilreiðsla á vatns- og setkerfi (ibætt set)

22. b. Íbætta setið, sem er tilreitt samkvæmt lið 16.b, er sett í ílátin og kristöllunarskálina og yfirliggjandi vatni bætt við til að fá rúmmálshlutfall sets og vatns 1:4. Dýpt setlagsins skal vera á bilinu 1,5–3 cm (hún má vera nokkuð minni fyrir kristöllunarskálina). Til að komast hjá því að innihaldsefni setsins skiljist í sundur eða fingert efni þyrlist aftur upp meðan prófunarvatninu er bætt í vatnssúluna er hægt að hylja setið með plastskífu meðan vatni er hellt á það og fjarlægja skífuna strax þar á eftir. Annar útbúnaður kann einnig að vera við hæfi. Um leið og búið er að tilreiða íbætt set með yfirliggjandi vatni er æskilegt að prófunariðefnið geti aðskilist frá setinu í vatnsfasann (4.–5., 7. og 18. heimild). Þetta skal helst gert við þau hita- og loftunarskilyrði sem notuð eru í prófuninni. Viðeigandi jafnvægistími er set- og efnasértækur og getur verið allt frá klukkustundum upp í nokkra daga og í sjaldgæfum tilvikum allt að fimm vikum. Þar eð þetta gefur mörgum íðefnum tíma til að brotna niður er ekki beðið eftir að jafnvægi náist en mælt er með 48 klukkustunda jafnvægistíma. Lengja má þó jafnvægistímann þegar vitað er að helmingunartími niðurbrots íðefnisins í setinu er langur (sjá 8. lið). Við lok þessa frekari jafnvægistíma mæla styrk prófunariðefnisins í yfirliggjandi vatninu, gropuvatninu og setinu, a.m.k. hæsta styrk og lægri styrk (sjá 38. lið). Þessi magngreining á prófunariðefninu gerir kleift að reikna út massajöfnuð og setja fram niðurstöður á grundvelli mælinga á styrkleika.
23. Hylja skal prófunarílátin (t.d. með glerplötum). Ef nauðsyn krefur má bæta við vatni meðan á rannsókninni stendur, í staðinn fyrir það sem gufar upp, til að vatnshæðin verði eins og í upphafi. Þetta skal gert með því að nota eimað eða afjónað vatn til að koma í veg fyrir að sölt myndist. Kristöllunarskálar í eldisbúrum eru ekki huldar og það er leyfilegt, en ekki nauðsynlegt, að bæta við vatni á prófunartímabilinu þar eð eggjalengjumar komast aðeins í snertingu við vatnið í u.þ.b. einn dag og skálarnar eru eingöngu notaðar fyrir stuttan fasa í prófuninni.

Prófunarlífverum bætt við

24. Fjórum til fimm dögum áður en lirfum á fyrsta lirfustigi fyrir fyrstu kynslóð er bætt við skal taka eggjamassa úr ræktuninni og setja í lítil ílát í ræktunarmiðil. Nota má þroskaðan miðil úr stofnrækt eða nýtilreiddan miðil. Í öllum tilvikum skal bæta svolitlu magni af mat, t.d. nokkrum dropum af síuvökva úr fimmaláðri sviflausn úr fiskafóðri í flögum, út í ræktunarmiðilinn (sjá 2. viðbæti). Einungis skal nota nýklakta eggjamassa. Alla jafna byrja lirfurnar að klekjast nokkrum dögum eftir að eggjunum er verpt (2–3 dagar fyrir *C. riparius* við 20 °C og 1–4 dagar fyrir *C. dilutus* við 23 °C og *C. yoshimatsui* við 25 °C) og lirfur vaxa í fjórum lirfustigum en hvert stig tekur 4–8 daga. Nota skal fyrsta lirfustig (hámark 48 klst. eftir klak) í prófuninni. Hugsanlega er hægt að athuga lirfustig lirfa með því að mæla breidd höfuðskeljarinnar (7. heimild).

25. Tuttugu lirfur á fyrsta lirfustigi fyrir fyrstu kynslóð eru settar af handahófi með ávalri pípettu í hvert prófunarilát sem inniheldur set- og vatnskerfi. Hætta skal loftun vatnsins meðan lirfunum er bætt í prófunarilátin og halda því þannig í sólarhring eftir að lirfunum er bætt í (sjá 32. lið), Samkvæmt tilhögun prófunarinnar sem er notuð (sjá 19. og 20. lið) er fjöldi lirfa sem á að nota fyrir hvern styrkleika a.m.k. 120 (6 samhliða prófanir á hverju styrkleikastigi) að því er varðar aðferð fyrir EC_X og 160 fyrir aðferð til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (8 samhliða prófanir á hverju styrkleikastigi). Í tilhöguninni með íbættu seti hefst váhrif þegar lirfunum er bætt við.

Íbæting í yfirliggjandi vatn

26. Sólarhring eftir að lirfunum á fyrsta lirfustigi fyrir fyrstu kynslóð er bætt við er prófunariðefninu bætt í yfirliggjandi vatnssúluna og lítils háttar loftun sett af stað aftur (sjá 7. lið að því er varðar hugsanlegar breytingar á tilhögun prófunarinnar). Lítið magn af stofnlausn prófunariðefnisins er sett með pípettu undir yfirborð vatnsins. Síðan skal blanda yfirliggjandi vatn varlega til að hrófla ekki við setinu. Í tilhöguninni með íbættu vatni hefst váhrif þegar bætt er í vatnið (þ.e. einum degi eftir að lirfunum er bætt við).

Söfnun á fullvöxnum flugum sem hafa kviknað

27. Söfnun á kviknuðum mýflugum af fyrstu kynslóð fer fram a.m.k. einu sinni á dag, en helst tvisvar á dag (sjá 36. lið), úr prófunarilátinu þar sem notast er við útsogsdælu, sogbúnað (e. *exhauster*) eða svipaðan búnað (sjá 5. viðbæti). Gæta skal sérstakrar varúðar til að skaða ekki fullvöxnu flugurnar. Mýflugunum, sem safnað er úr fjórum prófunarilátum úr einni meðhöndlun, er sleppt í eldisbúrið sem þeim var úthlutað áður. Daginn sem fyrsta kviknun á sér stað (karldýr) er lítið magn af stofnlausn prófunariðefnisins sett undir yfirborð vatnsins með pípettu (tilhögun með íbættu vatni). Síðan skal blanda yfirliggjandi vatn varlega til að hrófla ekki við setinu. Styrkur prófunariðefnisins í kristöllumarskálinni er venjulega sá sami og í meðhöndlunarlátunum sem er úthlutað viðkomandi eldisbúri. Að því er varðar tilhögunina með íbættu seti skal tilreiða kristöllumarskálarnar á u.þ.b. 11. degi eftir að váhrif hefst (þ.e. lirfum af fyrstu kynslóð bætt við) þannig að hægt sé að jafnvægisstilla þær í um 48 klukkustundir áður en fyrstu eggjalengjurnar myndast.
28. Eggjalengjunum er safnað úr kristöllumarskálinni í eldisbúrinu með töng eða ávalri pípettu. Hver eggjalengja er sett í ílát sem inniheldur ræktunarmiðil úr kristöllumarskálinni sem þeim var safnað úr (t.d. hólur í 12 hola örbakka ásamt 2,5 ml af miðli). Ílátin með eggjalengjunum eru sett undir lok til að koma í veg fyrir mikla uppgufun. Eggjalengjurnar eru hafðar undir eftirliti í a.m.k. sex daga eftir að þær hafa myndast svo að hægt sé að flokka þær sem frjóar eða ófrjóar.

Til að koma annarri kynslóð á fót skal velja a.m.k. þrjár, en helst sex, frjóar eggjalengjur úr hvoru eldisbúri og láta þær klekjast ásamt fæðu. Þessar eggjalengjur skulu hafa myndast þegar eggvarp er í hámarki, sem á sér vanalega stað á u.þ.b. 19. prófunardegi í samanburðinum. Æskilegast er að önnur kynslóð af öllum meðhöndlunum hefjist á sama degi en vegna iðefnatengdra áhrifa á lirfuproskun er það e.t.v. ekki alltaf mögulegt. Í slíkum tilvikum getur meðhöndlun með hærri styrk hafist síðar en meðhöndlun með lægri styrk og samanburður (með leysi).

29. a. Í tilhöguninni með íbættu vatni er set- og vatnskerfið fyrir aðra kynslóð tilreitt með því að bæta prófunariðefninu í yfirliggjandi vatnssúluna u.þ.b. 1 klukkustund áður en lirfur á fyrsta lirfustigi eru settar út í prófunarilátin. Lítið magn af lausn prófunariðefnisins er sett með pípettu undir yfirborð vatnsins. Síðan skal blanda yfirliggjandi vatn varlega til að hrófla ekki við setinu. Lítils háttar loftun er sett af stað eftir íbætingu.
29. b. Í tilhöguninni með íbættu seti eru váhrifalátin sem innihalda set- og vatnskerfið fyrir aðra kynslóð tilreidd á sama hátt og fyrir fyrstu kynslóð.
30. Tuttugu lirfur á fyrsta lirfustigi (hámark 48 klst. eftir klak) af annarri kynslóð eru settar af handahófi með ávalri pípettu í hvert prófunarilát sem inniheldur íbætt set- og vatnskerfi. Hætta skal loftun vatnsins meðan

lirfunum á fyrsta lirlustigi er bætt í prófunarilátin og halda því þannig í sólarhring til viðbótar eftir að lirlunum er bætt í. Samkvæmt tilhögun prófunarinnar sem er notuð (sjá 19. og 20. lið) er fjöldi lirfa sem á að nota fyrir hvern styrkleika a.m.k. 120 (6 samhliða prófanir á hverju styrkleikastigi) að því er varðar aðferð fyrir EC_x og 160 fyrir aðferðina til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (8 samhliða prófanir á hverju styrkleikastigi).

Fæða

31. Nauðsynlegt er að fódra lirlurnar í prófunarilátinu, helst daglega eða a.m.k. þrisvar í viku. Fiskafóður (sviflausn í vatnið eða finmöluð fæða, t.d. Tetra-Min eða Tetra-Phyll; sjá nánar í 2. viðbæti) í magninu 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg fyrir *C. yoshimatsui*) á hverja lirlu á dag er nægilegt magn fæðu fyrir ungar lirlur fyrstu 10 dagana í þroskun þeirra. Nauðsynlegt gæti reynst að gefa eldri lirlum svolítið meiri fæðu: 0,5–1,0 mg á hverja lirlu á dag ætti að nægja það sem eftir er af prófuninni. Minnka skal matarskammtinn í öllum meðhöndlunum og samanburðarhópum ef sveppavöxtur sést eða ef vart verður við að dýr drepast í samanburðarhópum. Ef ekki er unnt að stöðva sveppavöxtinn skal endurtaka prófunina.

Eiturefnafræðilegt gildi váhrifa vegna inntöku er almennt meira í íðefnum sem er mjög sækin í lifrænt kolefni eða íðefnum sem eru tengd setinu með samgildum tengjum. Þar af leiðir að við prófanir á íðefnum með slíka eiginleika er hægt að bæta því magni af fæðu sem er nauðsynlegt til að tryggja lifun og náttúrulegan vöxt lirlanna við samsetta setið fyrir stöðgunartímabilið, með hliðsjón af reglufestum kröfum. Til að koma í veg fyrir að vatnsgæði spillist skal nota plöntuefni í stað fiskafóðurs, t.d. sem 0,5% viðbót (þurrvigti) af finmöluðum laufum af brenninetlu (*Urtica dioica*), mórberjatré (*Morus alba*), hvítmára (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia olerace*) eða öðru plöntuefni (*Cerophyl* eða α -sellulósa). Viðbót af fullum skammti af lifrænum fóðurgjafa í setið fyrir íbætingu er hvorki án afleiðinga að því er varðar vatnsgæði og liffræðilega virkni (21. heimild) né stöðluð aðferð, en nýlegar rannsóknir benda til þess að þessi aðferð virki (19. og 26. heimild). Fullvaxnar mýflugur í eldisbúi þarf vanalega ekki að fódra en baðmullarhnoðri, bleyttur í mettaðri súkrósalausn, sem boðinn er fram sem fæðugjafi fyrir fullvaxnar flugur sem hafa kviknað (34. heimild), getur aukið frjósemismátt og frjósemi.

Ræktunarskilyrði

32. Yfirliggjandi vatn í prófunarilátunum er loftað varlega í sólarhring eftir að lirlum á fyrsta lirlustigi af báðum kynslóðum er bætt í og því er haldið áfram meðan á prófuninni stendur (þess skal gætt að styrkur uppleysts súrefnis falli ekki niður fyrir 60% af mettunargildi lofts). Loftað er gegnum Pasteur-pípettu úr gleri þar sem úttakið er fest 2–3 cm ofan við setlagið og sleppir einni eða nokkrum loftbólum á sekúndu. Þegar rokgjörm íðefni eru prófuð skal gæta þess að lofta ekki set- og vatnskerfið en um leið skal gildisviðmiðun um lágmarkið 60% mettunargildi lofts (10. liður) uppfyllt. Frekari leiðbeiningar eru gefnar í 16. heimild.
33. Prófunin með *C. riparius* er framkvæmd við stöðugt hitastig, 20 °C (± 2 °C). Að því er varðar *C. dilutus* og *C. yoshimatsui* er mælt með hitastiginu 23 °C og 25 °C (± 2 °C), í þeirri röð. Notuð er 16 klst. ljóslota og ljósstyrkur skal vera 500 til 1000 lúx. Að því er varðar eldisbúrin þá er hægt að bæta við einni klukkustund fyrir dögum og rökkur.

Tímalengd váhrifa

34. Tilhögun með íbættu vatni: Váhrifatímabilið fyrir fyrstu kynslóð hefst þegar prófunaríðefninu er bætt í yfirliggjandi vatnið í prófunarilátunum (sem er einum degi eftir að lirlunum er bætt við — sjá 7. lið að því er varðar hugsanlegar breytingar á tilhögun váhrifa). Váhrif á aðra kynslóð lirfa hefjast strax þar eð þær eru settar í set- og vatnskerfi sem þegar er búið að íbæta. Hámarksváhrifatími fyrir fyrstu kynslóð er 27 dagar og fyrir aðra kynslóð 28 dagar (fyrstu kynslóðar lirlur eyða einum degi í ílátunum án váhrifa) að því er varðar *C. riparius* og *C. yoshimatsui*. Að teknu tilliti til skörunarinnar er heildarprófunartíminn u.þ.b. 44 dagar. Fyrir *C. dilutus* er hámarksváhrifatími 64 og 65 dagar fyrir fyrstu og aðra kynslóð, í þeirri röð. Heildartíminn er u.þ.b. 100 dagar.

Tilhögun með íbættu seti: váhrif hefjast þegar lirlunum er bætt við og hámarkið er 28 dagar fyrir báðar kynslóðir að því er varðar *C. riparius* og *C. yoshimatsui* og að hámarki 65 dagar fyrir báðar kynslóðir að því er varðar *C. dilutus*.

Athuganir

Kviknun

35. Þroskunartími og heildarfjöldi fullkviknaðra og lifandi karl- og kvenmýflugna eru ákvarðaðir fyrir báðar kynslóðir. Auðvelt er að þekkja karlflugurnar á fjöðurlaga fálmurum og mjóum bók.
36. Athuga skal prófunarilát beggja kynslóða a.m.k. þrisvar í viku til að meta sjónrænt hvort um er að ræða óeðlilegt atferli lírfanna (t.d. fara úr setinu, synda á óvenjulegan hátt) miðað við samanburðinn. Á tímabilinu þegar kviknun fer fram, sem hefst u.þ.b. 12 dögum eftir að lírfum *C. riparius* og *C. yoshimatsui* er bætt við (eftir 20 daga að því er varðar *C. dilutus*), eru kviknaðar mýflugur taldar og kyn þeirra ákvarðað a.m.k. daglega en helst tvisvar á dag (snemma að morgni og síðdegis). Eftir sanngreiningu eru mýflugurnar af fyrstu kynslóðinni fjarlægðar varlega úr ílátunum og fluttar í eldisbúr. Mýflugur af annarri kynslóð eru fjarlægðar og aflífaðar eftir sanngreiningu. Öllum eggjalengjum í prófunarílátum fyrstu kynslóðarinnar skal safna sérstaklega og flytja, með a.m.k. 2,5 ml af vatninu úr prófunarílatinu, í tólf hola örþakka (eða annað hentugt ílát) sem er settur undir lok til að koma í veg fyrir mikla uppgufun. Einnig skal skrá fjölda dauðra lírfa og sýnilegra púpa sem hafa ekki kviknað. Dæmi um eldisbúr, prófunarilát og sogbúnað eru sett fram í 5. viðbæti.

Æxlun

37. Áhrif á æxlun eru metin með fjölda þeirra eggjalengja sem myndast hjá fyrstu kynslóð mýflugna og frjósemi þessara eggjalengja. Eggjalengjunum er safnað einu sinni á dag úr kristöllumarskálinni sem er sett í hvert eldisbúr. Safna skal eggjalengjum og flytja þær með a.m.k. 2,5 ml af vatninu úr prófunarílatinu í tólf hola örþakka (ein eggjalengja í hverja holu), eða annað hentugt ílát, sem er settur undir lok til að koma í veg fyrir mikla uppgufun. Eftirfarandi eiginleikar eru skjalfestir fyrir hverja eggjalengju: myndunardagur, stærð (eðlileg, þ.e. $1,0 \pm 0,3$ cm eða minni, yfirleitt $\leq 0,5$ cm) og bygging (eðlileg = bananalögun með spirallaga eggjastreng eða óeðlileg, t.d. ekki spirallaga eggjastreng) sem og frjósemi (frjó eða ófrjó). Frjósemi eggjalengju er metin innan sex daga frá því hún myndast. Eggjalengja telst frjó þegar a.m.k. þriðjungur eggjanna klekst. Heildarfjöldi kvendýra sem bætt er við í eldisbúr er notaður til að reikna út fjölda eggjalengja á hvert kvendýr og fjölda frjórra eggjalengja á hvert kvendýr. Ef þörf krefur er hægt að áætla fjölda eggja í eggjalengju án eyðileggingar með hringtalningaraðferðinni (e. *ring count method*) (lýst nánar í 32. og 33. heimild).

Greiningarmælingar

Styrkur prófunariðefnisins

38. Greina skal að lágmarki sýni úr yfirliggjandi vatni, gropuvatni og seti við upphaf váhrifa (ef um er að ræða íbætingu í vatn, þá helst klukkustund eftir að því er bætt í) og við lok prófunarinnar, við hæsta styrk og lægri styrk. Þetta á við um ílát fyrir báðar kynslóðir. Aðeins skal greina yfirliggjandi vatnið úr kristöllumarskálinni í eldisbúrinu þar eð eggjalengjurnar komast í snertingu við það (að því er varðar tilhögun með íbættu seti getur greiningarleg staðfesting á styrk sets komið til greina). Ef nauðsyn krefur er hægt að gera frekari mælingar á seti, gropuvatni eða yfirliggjandi vatni meðan á prófuninni stendur. Þessar ákvarðanir á styrk prófunariðefnisins veita upplýsingar um hegðun/skiptingu prófunariðefnisins í vatns- og setkerfinu. Til að framkvæma magngreiningar er þörf á fleiri prófunarílátum fyrir sýnatöku úr seti og gropuvatni sem fer fram í upphafi og meðan á prófuninni stendur (sjá 39. lið). Vera má að mælingar í seti í tilhöguninni með íbættu vatni séu ekki nauðsynlegar ef skipting prófunariðefnisins milli vatns og sets hefur verið ákvörðuð með skýrum hætti í vatns- og setranssókn við sambærileg skilyrði (t.d. hlutfall sets og vatns, notkunaræferð, lífrænt kolefnainnihald setsins), eða ef sýnt er fram á að mældur styrkur í yfirliggjandi vatninu haldist innan 80–120% af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk.
39. Þegar millimælingar eru framkvæmdar (t.d. á 7. degi og/eda 14. degi), og ef það þarf stór sýni í greininguna sem ekki er hægt að taka úr prófunarílátum án þess að það hafi áhrif á prófunarkerfið, skal gera magngreiningar á sýnum úr prófunarílátum sem var bætt í og hafa verið meðhöndluð á sama hátt (þ.m.t. að því er varðar tilvist prófunarlífvera) en ekki verið notuð til líffræðilegrar athugunar.

40. Skiljun, t.d. við 10 000 g og 4 °C í 30 mínútur, er sú aðferð sem mælt er með til að einangra millivatn (gropuvatn). Ef sýnt er að prófunariðefnið ásogast ekki við síur getur þó síun einnig verið hentug. Í sumum tilvikum er ef til vill ekki mögulegt að greina styrk í gropuvatni vegna þess að magn sýnisins er of lítið.

Eðlisefnafræðilegir mæliþættir

41. Mæla skal sýrustig, uppleyst súrefni í prófunarvatninu og hitastig vatnsins í prófunarilátunum og kristöllumarskálunum á viðeigandi hátt (sjá 10. lið). Mæla skal hörku og ammoníak í samanburðinum og í einu prófunariláti og kristöllumarskál við hæsta styrk við upphaf og við lok prófunarinnar.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

42. Tilgangurinn með þessari prófun á lífsferli er að ákvarða áhrif prófunariðefnis á æxlun og, fyrir tvær kynslóðir, hraða þroskunar og heildarfjölda fullkviknaðra og lifandi karl- og kvenmýflugna. Safna skal gögnum saman um kvikunarhlutfall hjá karldýrum og kvendýrum. Ef ekki er neinn marktækur tölfræðilegur munur á næmi í hraða þroskunar hjá kynjunum má hópa niðurstöður um karl- og kvenflugur til tölfræðilegra greininga.
43. Styrkáhrif, gefin upp sem styrkur í yfirliggjandi vatninu (fyrir íbætt vatn) eða setinu (fyrir íbætt set), eru yfirleitt reiknuð út á grundvelli mælds styrks við upphaf váhrifanna (sjá 38. lið). Að því er varðar íbætt vatn er þ.a.l. reiknað út meðaltal af þeim styrk, sem er yfirleitt mældur við upphaf váhrifanna í yfirliggjandi vatninu í ílátinu fyrir báðar kynslóðir og kristöllumarskálarnar, fyrir hverja meðhöndlun. Að því er varðar íbætt set er reiknað út meðaltal af þeim styrk, sem er yfirleitt mældur við upphaf váhrifanna í ílátinu fyrir báðar kynslóðir (og valfrjálst er að mæla styrkinn í kristöllumarskálunum), fyrir hverja meðhöndlun.
44. Til að reikna út punktmat, þ.e. EC_x , er hægt að nota tölfræðilegar upplýsingar um hvert ílát og hvert eldisbúr sem eiginlegar, samhliða prófanir. Við útreikning á öryggisbili fyrir öll EC_x skal taka breytileika milli íláta með í reikninginn eða sýna að þessi breytileiki sé svo lítill að hægt sé að líta fram hjá honum. Þegar líkanið er aðlagð með aðferð minnstu ferveika (e. *Least Squares*) skal nota umbreytingar á tölfræðilegar upplýsingar um hvert ílát til að bæta einsleitni dreifinnar. Þó skal reikna EC_x -gildin eftir að svöruninni hefur verið umbreytt til baka í upprunalega gildið (31. heimild).
45. Þegar tölfræðileg greining miðar að því að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif með tilgátuprófun þarf að taka breytileika milli íláta með í reikninginn, sem er tryggt með því að nota dreifnigreiningu (t.d. prófunaraðferðir Williams og Dunnetts). Williams-prófun er viðeigandi ef búist er við einhalla skammtasvörun fræðilega séð og Dunnetts-prófunin er viðeigandi þegar tilgátan um einhalla helst ekki. Að öðrum kosti geta traustari prófanir (27. heimild) verið viðeigandi við aðstæður þar sem ekki er hægt að nota venjulegar forsendur dreifnigreiningar (31. heimild).

Kvikunarhlutfall

46. Kvikunarhlutföll eru skammtabundin gögn og unnt er að greina þau með því að nota Cochran-Armitage-prófun á stíglækkandi hátt ef búist er við einhalla skammtasvörun og þessi gögn eru í samræmi við þessar væntingar. Ef ekki, er hægt að nota nákvæmiprófun Fishers eða Mantel-Haenszel-prófun með aðlöguðum p-gildum Bonferroni-Holm. Ef visbendingar eru um meiri breytileika milli samhliða prófana innan sama styrkleika en tvíliða dreifing bendir til (oft nefnt aukalegur tvíliðubreytileiki) skal nota trausta Cochran-Armitage-prófun eða nákvæmiprófun Fishers eins og lagt er til í 27. heimild.

Summa lifandi mýflugna (karldýra og kvendýra) sem kviknuðu í hverju íláti, n_e , er ákvörðuð og deilt í hana með fjölda lirfa sem settar voru í það, n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

þar sem:

ER = kvikunarhlutfall

n_e = fjöldi lifandi mýflugna sem kviknaði í hverju íláti

n_a = fjöldi lirfa sem var settur í hvert ílát (yfirleitt 20)

Þegar n_e er stærra en n_a (þ.e. þegar meira en fyrirhuguðum fjölda lirfa er óviljandi bætt við) skal n_a vera jafnt n_e .

47. Önnur aðferð, sem hentar best fyrir stór úrtök, ef um er að ræða aukalegan tvíliðubreytileika, er að meðhöndla kvikunarhlutfallið sem stöðuga svörum og nota aðferðir sem eru í samræmi við þessi gögn um kvikunarhlutfall. Mikil úrtaksstærð er skilgreind hér sem úrtak þar sem fjöldinn sem kviknaði og fjöldinn sem kviknaði ekki fer í báðum tilvikum yfir fimm á hverja samhlíða prófun (ílát).
48. Við dreifnigreiningu ætti fyrst að umbreyta hlutfallsgildum kvikunar (ER) með arkarsinus afkvaðratrótinni (arcsin-sqrt-umbreytingu), eða Freeman-Tukey-umbreytingu, til að fá áætlaða normaldreifingu og til að jafna dreifni. Hægt er að nota Cochran-Armitage-prófun, nákvæmniþrófun Fishers (Bonferroni) eða Mantel-Haenszel-prófun ef fjöldi er notaður. Arcsin-sqrt-umbreytingu er beitt með því að taka arkarsinus (\sin^{-1}) af kvaðratrót ER.
49. Að því er varðar kvikunarhlutföll eru EC_x -gildi reiknuð út með því að nota aðhvarfsgreiningu (t.d. probit-, logit- eða Weibull-líkan (28. heimild). Ef aðhvarfsgreining tekst ekki (t.d. ef það eru færri en tvö hlutasvör) er hægt að nota aðrar stikalausar aðferðir, s.s. hlaupandi meðaltal eða einfaldan innreikning.

Hraði þroskunar

50. Meðaltalsþroskunartími sýnir meðaltalstímabilið milli þess að lirfurnar eru settar í (dagur 0 í prófuninni) og þangað til tilraunahópur mýflugna kviknar (taka skal tillit til aldurs lirfanna við ísetningu við útreikning á raunþroskunartíma). Hraði þroskunar (eining: 1/dagur) er umhverfa þroskunartímans og sýnir þann hluta lirfuþroskunar sem á sér stað á hverjum degi. Hraði þroskunar er ákjósanlegastur til að meta þessar rannsóknir á eiturrhifum í seti þar eð dreifni hans er minni, hann er einsleitari og nær normaldreifingu samanborið við þroskunartíma. Þar af leiðandi er hægt að nota öflugri, stikabundnar prófunaraðferðir með þroskunarhraða í stað þroskunartíma. Að því er varðar hraða þroskunar sem samfellda svörum er hægt að meta EC_x -gildi með aðhvarfsgreiningu (t.d. (29.–30. heimild)). Með dreifnigreiningu, t.d. Williams- eða Dunnetts-prófun, er hægt að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif fyrir meðaltalshraða þroskunar. Þar sem karldýr kvikna fyrr en kvendýr, þ.e. þroskunarhraði er meiri, þykir rétt að reikna út hraða þroskunar sérstaklega fyrir hvort kyn um sig til viðbótar við hraða þroskunar fyrir heildarfjölda mýflugnanna.
51. Að því er varðar tölfræðilegar prófanir: fjöldi mýflugna sem sést á skoðunardag x sem búist er við að hafi kviknað að meðaltali á tímabilinu á milli dags x og dags $x - 1$ (1 = lengd skoðunarmillibils, yfirleitt 1 dagur). Meðaltalshraði þroskunar í hverju íláti (\bar{x}) er reiknaður út í samræmi við:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i X_i}{n_e}$$

þar sem:

\bar{x} : meðaltalshraði þroskunar í hverju íláti

i : stuðull fyrir skoðunarmillibil

m : hámarksfjöldi skoðunarmillibila

f_i : fjöldi mýflugna sem kviknaði í skoðunarmillibili i

n_c : heildarfjöldi mýflugna sem kviknaði við lok tilraunar (= Σf_i)

x_i : hraði þroskunar hjá mýflugum sem kviknuðu í millibili i

$$x_i = 1 / \text{dagur}_i - \frac{l_i}{2}$$

þar sem:

dagur_i : skoðunardagur (dagur frá því að lifurnar eru settar í)

l_i : lengd skoðunarmillibils i (dagur, yfirleitt 1 dagur)

Kynjahlutfall

52. Kynjahlutföll eru skammtabundin gögn og því skal meta þau með nákvæmniprófun Fishers eða öðrum viðeigandi aðferðum. Náttúrulegt kynjahlutfall *C. riparius* er einn, þ.e. karldýr og kvendýr eru jafnmörg. Gögnin um kynjahlutfall skulu meðhöndluð með sama hætti fyrir báðar kynslóðir. Þar eð hámarksfjöldi mýflugna í hverju íláti (þ.e. 20) er of lítill fyrir marktæka tölfræðilega greiningu skal leggja saman heildarfjölda fullkviknaðra og lifandi mýflugna af hvoru kyni fyrir öll ílát í einni meðhöndlun. Þessi óumbreyttu gögn eru prófuð á móti samanburðarhópi (með leysi) eða safngögnum úr samanburðarhópi í tengslatöflu sem er 2×2 .

Æxlan

53. Æxlan, sem frjósemismáttur, er reiknuð út sem fjöldi eggjalengja á hvert kvendýr. Nánar tiltekið er deilt í heildarfjölda eggjalengja, sem myndast í eldisbúri, með heildarfjölda lifandi og óskaddaðra kvendýra sem bætt er í viðkomandi búr. Með dreifnigreiningu, t.d. Williams- eða Dunnetts-prófun, er hægt að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif fyrir frjósemismátt.
54. Frjósemi eggjalengjanna er notuð til að mogngreina frjóar eggjalengjur á hvert kvendýr. Deilt er í heildarfjölda frjóra eggjalengja, sem myndast í eldisbúri, með heildarfjölda lifandi og óskaddaðra kvendýra sem bætt er í viðkomandi búr. Með dreifnigreiningu, t.d. Williams- eða Dunnetts-prófun, er hægt að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif fyrir frjósemi.

Prófunarskýrsla

55. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunariðefni:

- eðliseiginleikar og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (vatnsleysni, gufuþrýstingur, log K_{ow} , deilistuðull í jarðvegi (eða í seti ef hann liggur fyrir) stöðugleiki í vatni og seti, o.s.frv.),
- efnafræðileg sanngreiningargögn (almennt heiti, efnaheiti, byggingarformúla, CAS-númer, o.s.frv.), þ.m.t. hreinleiki og greiningaraðferð til að magnákvæða prófunariðefnið.

Prófunartegund:

- prófunarlífverur sem eru notaðar: tegundir, vísindaheiti, uppruni lífvera og ræktunarskilyrði,
- upplýsingar um hvernig meðhöndlun á eggjamössum og liffum var háttað,

- upplýsingar um meðhöndlun á fullvöxnum flugum af fyrstu kynslóð sem hafa kviknað með aðstoð sogbúnaðar o.s. frv. (sjá 5. viðbæti),
- aldur prófunarlífveranna úr fyrstu og annarri kynslóð þegar þær voru settar í prófunarilátin.

Prófunarskilyrði:

- set sem er notað, þ.e. náttúrulegt eða samsett set (gerviset),
- náttúrulegt set: staðsetning og lýsing á sýnatökustað þar sem setið var tekið, þ.m.t., ef unnt er, mengunarsaga; eiginleikar sets: sýrustig, lífrænt kolefnainnihald, hlutfall kolefnis og köfnunarefnis (C/N) og kornastærðarmælingar (ef við á),
- samsett set: tilreiðsla, innihaldsefni og eiginleikar (lífrænt kolefnainnihald, sýrustig, raki o.s.frv. mælt við upphaf prófunarinnar),
- tilreiðsla á prófunarvatninu (ef endurgert vatn er notað) og eiginleikar (súrefnisstyrkur, sýrustig, harka o.s.frv. mælt við upphaf prófunarinnar),
- dýpt sets og yfirliggjandi vatns fyrir prófunarilát og kristöllumarskálar,
- rúmmál yfirliggjandi vatns og gropuvatns; þyngd á blautu seti með og án gropuvatns fyrir prófunarilát og kristöllumarskálar,
- prófunarilát (efni og stærð),
- kristöllumarskálar (efni og stærð),
- eldisbúr (efni og stærð),
- aðferð við tilreiðslu stofnlausnar og prófunarstyrkur fyrir prófunarilát og kristöllumarskálar,
- ísetning prófunariðefnis í prófunarilát og kristöllumarskálar: prófunarstyrkur, fjöldi samhliða prófana og notkun á leysi ef þörf er á,
- ræktunarskilyrði fyrir prófunarilát: hitastig, lýsingarhringrás og -styrkur, loftun (loftbólur á sekúndu),
- ræktunarskilyrði fyrir eldisbúr og kristöllumarskálar: hitastig, lýsingarhringrás og -styrkur,
- ræktunarskilyrði fyrir eggjalengjur í örbökkum (eða öðrum ílátum): hitastig, lýsingarhringrás og -styrkur,
- ítarlegar upplýsingar um fôðrun ná yfir tegund fæðu, tilreiðslu, magn og fôðrunarfyrirkomulag.

Niðurstöður:

- nafngildi prófunarstyrks, mældur prófunarstyrkur og niðurstöður úr öllum greiningum til að ákvarða styrk prófunariðefnisins í prófunarilátunum og kristöllumarskálunum,
- vatnsgæði í prófunarilátunum og kristöllumarskálunum, þ.e. sýrustig, hitastig, uppleyst súrefni, harka og ammoníak,
- endurnýjun á prófunarvatni sem gufað hefur upp í prófunarilátunum, ef um slíkt er að ræða,
- fjöldi karl- og kvenmýflugna sem kvikna í hverju íláti og á hverjum degi, í fyrstu og annarri kynslóð,
- kynjahlutfall fullkviknaðra og lifandi mýflugna á hverja meðhöndlun í fyrstu og annarri kynslóð,
- fjöldi lirfa sem ekki kviknuðu sem mýflugur í hverju íláti í fyrstu og annarri kynslóð,
- hlutfall/brot kviknunar á hverja samhliða prófun og prófunarstyrk (karl- og kvenmýflugur í safnsýni) í fyrstu og annarri kynslóð,
- meðaltalshraði þroskunar hjá fullkviknuðum og lifandi mýflugum á hverja samhliða prófun og meðhöndlunarhlutfall (karl- og kvendýr aðskilin og einnig í safnsýni) í fyrstu og annarri kynslóð,

- fjöldi eggjalengja sem settar eru í kristöllunarskálarnar í hvert eldisbúr og á hverjum degi,
- eiginleikar hverrar eggjalengju (stærð, löggun og frjósemi),
- frjósemismáttur — heildarfjöldi eggjalengja á heildarfjölda kvendýra sem bætt er við í eldisbúrið,
- frjósemi — heildarfjöldi frjórna eggjalengja á heildarfjölda kvendýra sem bætt er við í eldisbúrið,
- mat á endapunktum eitrunar, t.d. EC₅₀ (og tengdum öryggisbilum), styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif og tölfræðiaðferðir sem eru notaðar til að ákvarða hann,
- umfjöllun um niðurstöðurnar, þ.m.t. öll áhrif sem frávik frá prófunaraðferðinni hafa á niðurstöðu prófunarinnar.

HEIMILDIR

- 1) Kaffi C.27 í þessum viðauka, Prófun á eiturhrifum á mýflugulirfum í seti og vatni með notkun á íbættu vatni.
- 2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus (Camptochironomus) tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311–322.
- 3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- 4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- 5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- 6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.
- 7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.
- 8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- 9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- 10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyaella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- 11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyaella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.
- 12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- 13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- 14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- 15) Kaffi C.28 í þessum viðauka, Prófun á eiturhrifum á mýflugulirfum í seti og vatni með notkun á íbættu seti.

- 16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.
- 17) Weltje, L., Ruffi, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
- 18) Environment Canada. (1995), *Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
- 19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
- 20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- 21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- 22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- 23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
- 24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- 25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- 26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J Soils Sediments*, 9: 94-102.
- 27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
- 28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.
- 29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
- 30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
- 31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
- 32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
- 33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
- 34) OECD (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

*I. viðbætur***Skilgreiningar**

Í þessari prófunaraðferð eru notaðar eftirfarandi skilgreiningar:

Íðefni er efni eða blanda.

Samsett set eða endurgert set, gerviset eða tilbúið set er blanda efna sem er notað til að líkja eftir eðlisrænum efnisþáttum náttúrulegs sets.

Yfirleggjandi vatn er vatn sem er sett yfir setið í prófunarilátinu.

Millivatn eða gropuvatn er vatnið í rýminu á milli setsins og jarðvegsagnanna.

Íbætt vatn er prófunarvatn sem prófunariðefni hefur verið bætt í.

Prófunariðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

2. viðbætur

Ráðleggingar varðandi ræktun á *Chironomus riparius*

1. Hægt er að rækta *Chironomus* lirlur í kristöllumarskálum eða stærri ílátum. Finum kvarssandi er dreift í þunnu lagi, u.þ.b. 5 til 10 mm djúpu, yfir botninn á ílátinu. Einnig hefur verið sýnt fram á að kísilgúr sé hentugt undirlag (t.d. Merck, Art 8117) (þynnra lag, nokkrir millimetrar á þykkt, er nóg). Síðan er hæfilegu vatnsmagni bætt við þar til dýptin er nokkrir sentimetrar. Bæta skal við vatni eftir þörfum í staðinn fyrir tap vegna uppgufunar og koma í veg fyrir þurrkun. Hægt er að skipta um vatn ef nauðsyn krefur. Lofta skal varlega. Geyma skal lirlueldisílatin í hentugu búi sem kemur í veg fyrir að fullvaxin dýr sem kvikna sleppi út. Búið skal vera nægilega stórt til að gera fullvöxnum dýrum kleift að sveima, annars verður ef til vill engin mökun (lágmark er ca 30 × 30 × 30 cm).
2. Búr skulu höfð við stofuhita eða í rými þar sem umhverfið er stöðugt við 20 ± 2 °C með ljóslotu þar sem er bjart í 16 klst. (styrkleikastig ca 1000 lúx), dimmt í 8 klst. Greint hefur verið frá að loftraki sem er innan við 60% RH geti komi í veg fyrir fjölgun.

Þynningarvatn

3. Nota má allt hentugt vatn, náttúrulegt eða tilbúið. Brunnvatn, afklórað kranavatn og tilbúnir miðlar (t.d. miðillinn Elendt „M4“ eða „M7“, sjá hér á eftir) eru oft notuð. Loftblanda skal vatnið fyrir notkun. Ef nauðsyn krefur er hægt að endurnýja ræktunarvatnið með því að hella notaða vatninu eða sjúga það varlega úr ræktunarílatunum án þess að eyðileggja lirlufupurnar.

Fóðrun á lirlum

4. Fóðra skal *Chironomus* lirlur með fiskafóðri í flögum (Tetra Min®, Tetra Phyll® eða öðrum svipuðum tegundum af fiskafóðri, sem er bundið einkaleyfi) með a.m.k. 250 mg á hvert ílát á hverjum degi. Þetta er hægt að gefa sem þurr, malað duft eða sem sviflausn í vatni: 1,0 g af flögufóðri er bætt við 20 ml af þynningarvatni og blandað saman til að fá einsleita blöndu. Þessa blöndu má gefa í 5 ml skammti á hvert ílát á hverjum degi (hristist fyrir notkun). Eldri lirlur mega fá meira.
5. Fóðrun er aðlöguð samkvæmt vatnsgæðum. Ef ræktunarmiðillinn verður „skýjaður“ skal minnka fóðrunina. Vakta skal viðbót við fæðu vandlega. Of lítil fæða mun valda því að lirlan færir sig að vatnssúlunni og of mikil fæða mun valda aukinni virkni örvera og lægri súrefnisstyrk. Bæði skilyrðin geta leitt til minni vaxtarhraða.
6. Einnig má bæta nokkrum grænþörungafrumum við (t.d. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) þegar ný ræktunarílát eru sett upp.

Fóðrun á fullvöxnum flugum sem hafa kviknað

7. Nokkrar tilraunir benda til þess að baðmullarhnoðri, bleyttur í mettaðri súkrósalusn, geti nýst sem fæða fyrir fullvaxnar flugur sem hafa kviknað.

Kviknun

8. Fullvaxnar flugur byrja að kvikna úr lirlueldisílatunum við 20 ± 2 °C eftir u.þ.b. 13–15 daga. Karlfugurnar eru auðþekktanlegar á fjöðurlaga fálmurum og mjóum búk.

Eggjamassar

9. Um leið og fullvaxnar flugur eru til staðar í eldisbúrinu skal skoða öll lirlueldisílat þrisvar í viku til að kanna hvort hlaupkenndir eggjamassar hafi lagst til. Ef eggjamassar eru til staðar skal fjarlægja þá varlega. Þá skal setja í litla skál sem inniheldur sýni af ræktunarvatninu. Eggjamassar eru notaðir til að koma af stað nýrri ræktun í ræktunarílatum (t.d. 2–4 eggjamassar/ílát) eða notaðir í eiturrhifaþrófanir.
10. Fyrsta lirlustigið ætti að klekjast eftir 2–3 daga.

Uppsetning nýrra ræktunariláta

11. Um leið og ræktanir hafa fest sig í sessi ætti að vera mögulegt að setja upp ný lirlfuræktunarilát vikulega eða sjaldnar, með hliðsjón af prófunarkröfum, og fjarlægja eldri ilát eftir að fullvaxnar mýflugur hafa kviknað. Með því að nota þetta kerfi verður reglulegt framboð á fullvöxnum flugum í framleiðslu með lágmarksstyringu.

Tilreiðsla prófunarlausnanna „M4“ og „M7“

12. Elendt (1990) hefur lýst „M4“-miðlinum. „M7“-miðillinn er tilreiddur eins og „M4“-miðillinn að undanskildum efnunum sem eru tilgreind í töflu 1 en styrkur þeirra er fjórfalt lægri í „M7“ en í „M4“. Ekki skal tilreiða prófunarlausnina samkvæmt Elendt og Bias (1990) þar eð styrkur $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 og K_2HPO_4 sem gefinn er fyrir tilreiðslu á stofnlausnum er ekki fullnægjandi.

Tilreiðsla „M7“-miðils

13. Hver stofnlausn (I) er tilreidd sérstaklega og sameinuð stofnlausn (II) er tilreidd úr þessum stofnlausnum (I) (sjá töflu 1). 50 ml af sameinuðu stofnlausninni (II) og það magn af hverri stofnlausn með helstu næringarefnum sem er gefið upp í töflu 2 eru fyllt að 1 lítra með afjónuðu vatni til að tilreiða „M7“-miðilinn. Vítamínstofnlausn er tilreidd með því að bæta þremur vítamínum við afjónað vatn, eins og tilgreint er í töflu 3, og 0,1 ml af sameinaðri vítamínstofnlausn er bætt við endanlega „M7“-miðilinn rétt fyrir notkun. Vítamínstofnlausnin er geymd frosin í litlum deiliskömmtum. Miðillinn er loftblandaður og stöðgaður.

Tafla 1

Stofnlausnir af snefilefnum fyrir miðlana M4 og M7

Stofnlausnir (I)	Magn (mg) fyllt að 1 lítra af afjónuðu vatni	Til að tilreiða sameinaða stofnlausn (II): blanda skal eftirfarandi magn (ml) af stofnlausn (I) og fylla að 1 lítra af afjónuðu vatni		Endanlegur styrkur í prófunarlausnum (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1)	7210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1)	3040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	1260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004

Stofnlausnir (I)	Magn (mg) fyllt að 1 lítra af afjónuðu vatni	Til að tilreiða sameinaða stofnlausn (II): blanda skal eftirfarandi magn (ml) af stofnlausn (I) og fylla að 1 lítra af afjónuðu vatni		Endanlegur styrkur í prófunarlausnum (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ ·6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA·2H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ ·7H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Það er munur á þessum efnunum í M4 og M7 eins og tilgreint er hér að framan.

⁽²⁾ Þessar lausnir eru tilreiddar hver fyrir sig, síðan hellt saman og gufusæfðar tafarlaust.

Tafla 2

Stofnlausn með helstu næringarefnum fyrir miðlana M4 og M7

	Magn fyllt að 1 lítra af afjónuðu vatni (mg)	Magn stofnlausnar með helstu næringarefnum sem er bætt við til að tilreiða miðlana M4 og M7 (ml/l)	Endanlegur styrkur í prófunarlausnunum M4 og M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246600	0,5	123,3
KCl	58000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50000	0,2	10,0
NaNO ₃	2740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1840	0,1	0,184

Tafla 3

Vítamínstofnlausn fyrir miðlana M4 og M7

Allar þrjár vítamínlausnirnar eru sameinaðar til að útbúa eina vítamínstofnlausn.

	Magn fyllt að 1 lítra af afjónuðu vatni (mg)	Magn vítamínstofnlausnar sem er bætt við til að tilreiða miðlana M4 og M7 (ml/l)	Endanlegur styrkur í prófunarlausnunum M4 og M7 (mg/l)
Þíamínvetnisklóríð	750	0,1	0,075
Sýanókóbalamín (B12)	10	0,1	0,0010
Bíótín	7,5	0,1	0,00075

HEIMILDIR

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Strelke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

3. viðbætur

Tilreiðsla á samsettu seti

SAMSETNING SETS

Samsetning á samsettu seti skal vera sem hér segir:

Innihaldsefni	Eiginleikar	% af þurrvigt sets
Mór	Mosamór, eins nálægt pH-gildinu 5,5–6,0 og unnt er, engar sýnilegar plöntuleifar, fín malaður (kornastærð ≤ 1 mm) og loftþurrkaður	4–5
Kvarssandur	Kornastærð: > 50% af ögnunum skal vera á bilinu 50–200 μm	75–76
Kaólínitleir	Kaólínitinnihald $\geq 30\%$	20
Lífrænt kolefni	Stíllt með því að bæta við mó og sandi	2 ($\pm 0,5$)
Kalsíumkarbónat	CaCO_3 , malað í duft, af efnafræðilegum hreinleika	0,05–0,1
Vatn	Leiðni $\leq 10 \mu\text{S/cm}$	30–50

TILREIÐSLA

Mórin er loftþurrkaður og malaður í fingert duft. Sviflausn með tilskildu magni af módufti í afjönuðu vatni er tilreidd með afkastamiklum búnaði til að gera hana einsleita. pH-gildi þessarar sviflausnar er stíllt í $5,5 \pm 0,5$ með CaCO_3 . Sviflausnin er undirbúin í a.m.k. tvo daga og hrært varlega við 20 ± 2 °C til að stöðga sýrustigið og koma á stöðugum örveruefnisþáttum. pH-gildið er mælt aftur og ætti að vera $6,0 \pm 0,5$. Mósreiflausnin er síðan blönduð með öðrum innihaldsefnum (sandi og kaólínleir) og afjönuðu vatni til að fá einsleitt set með vatnsinnihald á bilinu 30–50% af þurrvigt setsins. pH-gildi endanlegrar blöndu er mælt enn einu sinni og stíllt í 6,5 til 7,5 með CaCO_3 ef nauðsyn krefur. Tekin eru sýni af setinu til að ákvarða þurrvigt og innihald af lífrænu kolefni. Síðan er mælt með því að áður en samsett set er notað í eiturrifaprófun á mýflugulirfum sé það undirbúið í sjö daga við sömu skilyrði og verða síðan ríkjandi í prófuninni.

GEYMSLA

Geyma má þurr innihaldsefni til tilreiðslu á gerviseti á þurrum og svölum stað við stofuhita. Ekki skal geyma samsett (blautt) set áður en það er notað í prófuninni. Það skal notað tafarlaust eftir 7 daga undirbúningstímabilið sem lýkur tilreiðslu þess.

HEIMILDIR

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

4. viðbætur

Efnifræðilegir eiginleikar hentugs þynningarvatns

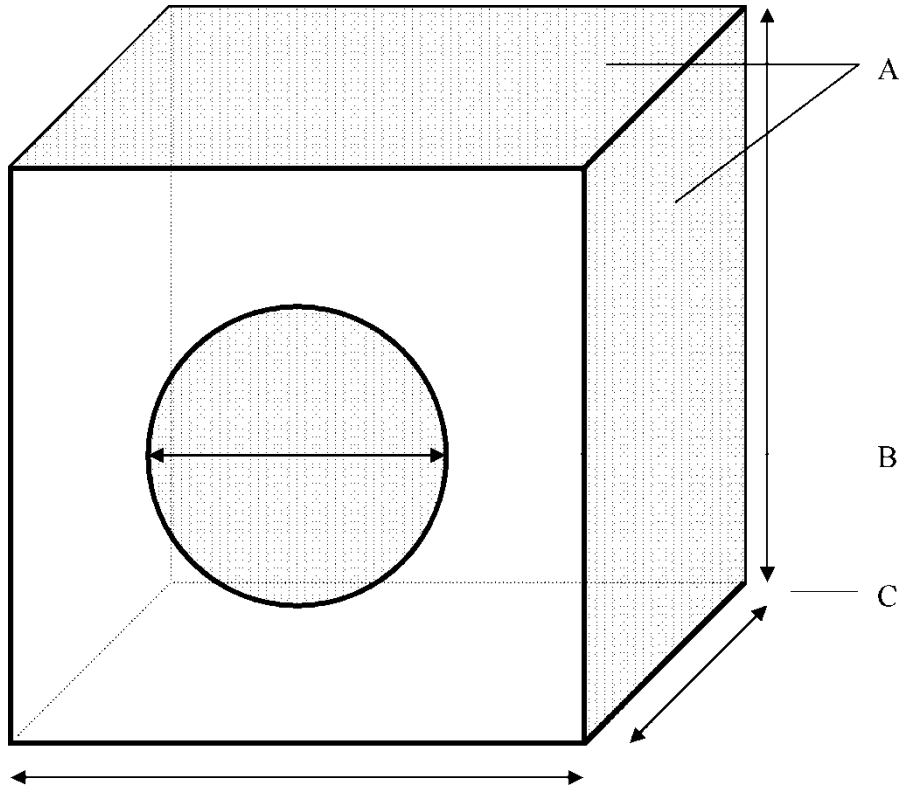
INNIHALDSEFNI	STYRKUR
Efnisagnir	< 20 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	< 2 mg/l
Ójónað ammoníak	< 1 µg/l
Harka sem CaCO ₃	400 mg/l (*)
Klórleifar	< 10 µg/l
Heildarstyrkur fosfórlífrænna varnarefna	< 50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjölkloruðum bifénylum	< 50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	< 25 ng/l

(*) Þó skal athygli vakin á því að ef grunur leikur á vaxlverkun milli jóna sem valda hörku og prófunariðefnis skal nota vatn með minni hörku (af þessum sökum skal ekki nota Elendt-Medium M4 við þessar aðstæður).

5. viðbætur

Leiðbeiningar um framkvæmd prófunar

Dæmi um eldisbúr:

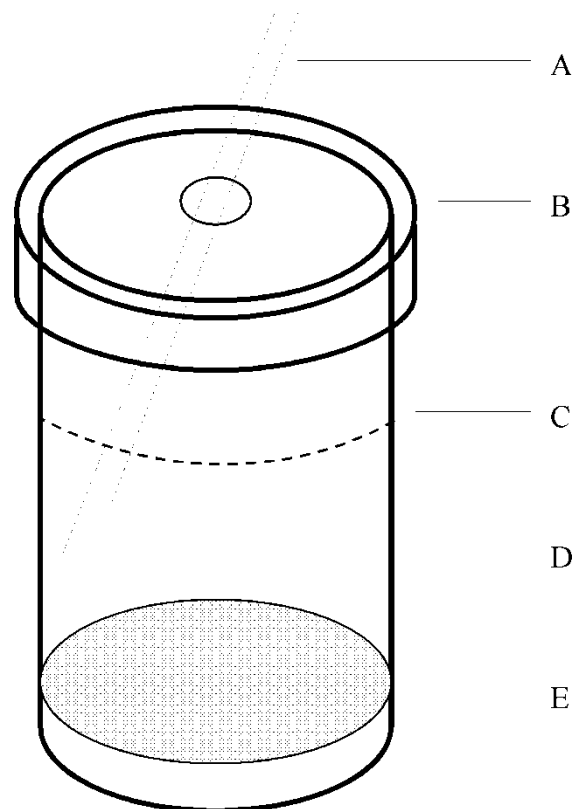


A: grisja að ofan og á a.m.k. einni hlið búrins (móskvastærð u.þ.b. 1 mm)

B: op til að hægt sé að koma fullvöxnum flugum sem hafa kviknað inn í eldisbúrið og til að fjarlægja eggjalengjur úr kristöllunarskálum (ekki sýnt á þessari teikningu)

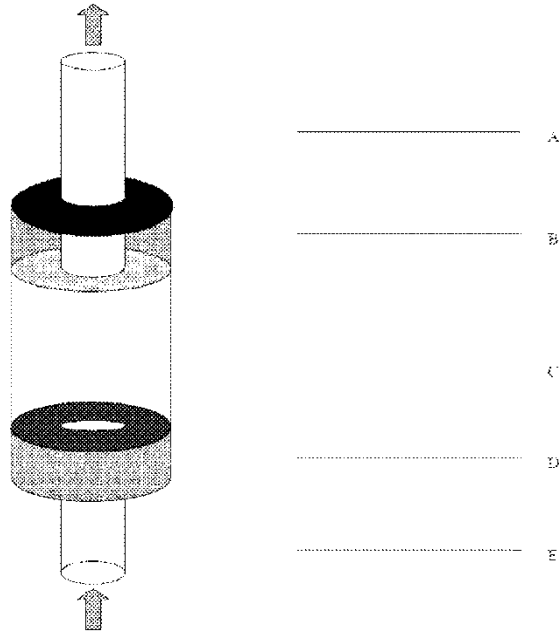
C: stærð eldisbúrs að lágmarki 30 cm langt, 30 cm hátt og 30 cm breitt

Dæmi um prófunarílát:



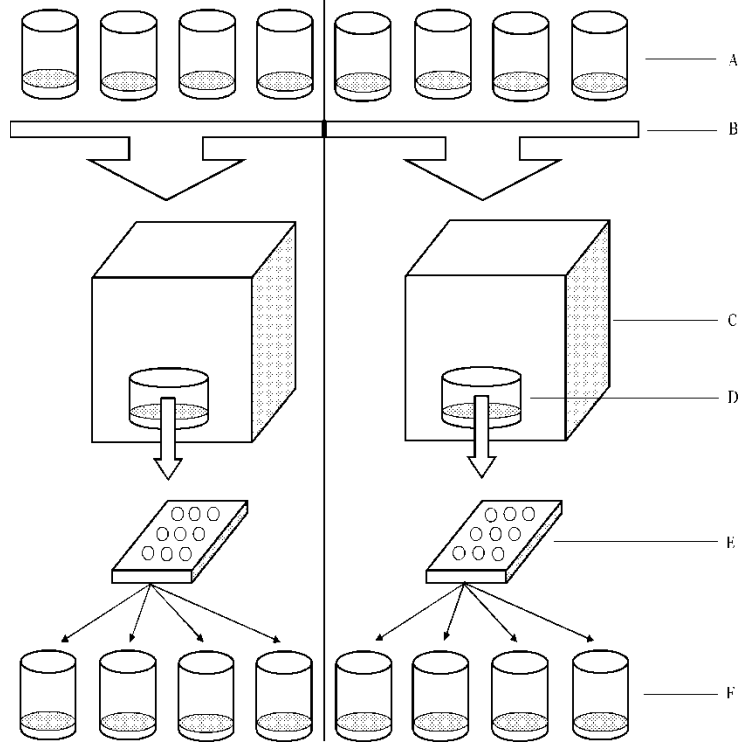
- A: pasteur-pípetta til að veita lofti í yfirliggjandi vatnið
- B: lok úr gleri til að koma í veg fyrir að kviknuðu mýflugurnar sleppi
- C: yfirborð vatns
- D: prófunarílát (bikarglas úr gleri að lágmarki 600 ml)
- E: setlag

Dæmi um sogbúnað til að fanga fullvaxnar mýflugur (örvarnar gefa til kynna stefnu loftstreymis):



- A: glerpípa (innra þvermál u.þ.b. 5 mm) tengd við sjálfsgugandi dælu
- B: tappi úr súlfuðu gúmmíi, gataður með glerpípu (A). Að innanverðu er opið á glerpípunni (A) er hulið með baðmull og grisju (möskvastærð u.þ.b. 1 mm) til að koma í veg fyrir að mýflugurnar skaddist þegar þær eru sognar upp í sogbúnaðinn
- C: gagnsætt ílát (plast eða gler, lengd u.þ.b. 15 cm) fyrir fangaðar mýflugur
- D: tappi úr súlfuðu gúmmíi, gataður með röri (E). Til að sleppa mýflugum inn í eldisbúr er tappi D losaður úr íláti C
- E: rör (plast eða gler, innra þvermál u.þ.b. 8 mm) til að safna fullvöxnum mýflugum úr íláti

Kerfisbundin framsetning á lífsferilsprófun:



- A: fyrsta kynslóð — prófunarilát innihalda set- og vatnskerfi, átta samhliða prófanir, 20 lirlur á fyrsta lirlustigi í hvert prófunarilát
- B: fjögur prófunarilát fyrir hvort eldisbúr, A og B
- C: eldisbúr (A og B) þar sem hægt er að sveima, parast og verpa eggjum
- D: kristöllunarskálar til að leggja eggjalengjurnar í
- E: örbakkar, ein hola fyrir hverja eggjalengju
- F: önnur kynslóð — prófunarilát innihalda set- og vatnskerfi, átta samhliða prófanir, 20 lirlur á fyrsta lirlustigi í hvert prófunarilát

C.41. PRÓFUN Á KYNÞROSKA FISKA

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 234 um prófanir (2011). Hún byggist á ákvörðun frá árinu 1998 um að þróa nýjar prófunaraðferðir, eða uppfæra þær, fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnun. Prófun á kynþroska fiska (FSDT) taldist lofa góðu sem prófunaraðferð sem nær yfir viðkvæmt æviskeið fiska sem eru næmir fyrir bæði estrógeni og íðefnum sem líkjast karlhormónunum. Prófunaraðferðin fór í gegnum fjölsetra fullgildingu á árunum 2006–2010 þegar japanskur rískarpi (*Oryzias latipes*), sebradanni (*Danio rerio*) og hornsili (*Gasterosteus aculeatus*) voru fullgilt og breiðkollur (*Pimephales promelas*) var fullgiltur að hluta til (41.–43. heimild). Þessi aðferðarlýsing nær yfir japanskan rískarpa, hornsili og sebradanna. Aðferðarlýsingin er að meginreglu styrking á OECD-viðmiðunarreglu um prófanir: „OECD TG 210 Fish, Early Life Stage Toxicity Test“ (1. heimild), þar sem váhrifunum er haldið áfram þangað til fiskarnir eru kynjaaðgreindir, þ.e. u.þ.b. 60 dögum eftir klak að því er varðar japanskan rískarpa, hornsili og sebradanna (váhrifatímabilið getur verið styttra eða lengra fyrir aðrar tegundir sem verða fullgiltar í framtíðinni), og næmum endapunktum innkirtla bætt við. Í prófun á kynþroska fiska eru metin áhrif snemma á lífsferlinum og hugsanlegar skaðlegar afleiðingar af meintum innkirtlatruflandi íðefnum (t.d. estrógenum, andrógenum og steramýndunarlotum) á kynþroska. Með samblandi af tveimur mikilvægum innkirtlaendapunktum, vítellógenínstyrk og svipfarslegu kynjahlutfalli, getur prófunin sýnt verkunarhátt prófunariðefnisins. Þar sem breytingar á svipfarslegu kynjahlutfalli eru stofntengdar er hægt að nota prófun á kynþroska fiska til hættu- og áhættumats. Ef prófunin er notuð til hættu- eða áhættumats skal þó ekki nota hornsili sökum þess að fullgildingargögn, sem hafa verið tiltæk fram að þessu, sýndu að breytingar á svipfarslegu kynjahlutfalli af völdum prófunariðefna hjá þessari tegund voru sjaldgæfar.
2. Aðferðarlýsingin er byggð á því að fiskar eru látnir verða fyrir váhrifum frá íðefnum í vatni þegar þeir eru á kynnæmu tímabili (e. *sex labile period*) en þá er búist við að fiskarnir séu næmastir fyrir áhrifum frá innkirtlatruflandi íðefnum sem raska kynþroskanum. Tveir mikilvægir endapunktur eru mældir sem mælikvarðar á innkirtlatengd þroskafrávik; styrkleikar vítellógeníns og kynjahlutfall (hlutföll kynja) og ákvarðaðir með vefjafræðilegri rannsókn á kynkirtlum. Vefjameinafræðileg greining kynkirtla (mat og stigsákvörðun eggfruma og sæðismýndunarfruma) er valkvæð. Auk þess er erfðafræðilegt kyn ákvarðað þegar unnt er (t.d. hjá japönskum rískarpa og hornsili). Ef erfðafræðilegt kynjamerki (e. *genetic sex marker*) er fyrir hendi er það verulegt hagræði þar eð það eykur styrk tölfræðilegra upplýsinga um kynjahlutfall og gerir kleift að greina einstaklingsbundin svipfarsleg kynskipti. Aðrir endapunktur sem skal mæla eru m.a. klakhraði, lifun, lengd og skrokkþyngd. Prófunaraðferðina er mögulega hægt að aðlaga að öðrum tegundum en þeim sem getið er hér að ofan að því tilskildu að tédar tegundir gangist undir fullgildingu sem er jafngild þeirri sem fram fór fyrir japanskan rískarpa, hornsili og sebradanna, að viðmiðunarfiskarnir séu kynjaaðgreindir við lok prófunarinnar, að vítellógeníngildi séu nógu há til að greina umtalsverðar íðefnatengdar breytingar og að næmi prófunarkerfisins sé fastsett með notkun viðmiðunariðefna sem hafa áhrif á innkirtla ((and)-estrógen, (and)-andrógen, arómatasalata o.s.frv.). Auk þess skal Efnahags- og framfarastofnunin endurskoða allar fullgildingarskýrslur þar sem vísað er til prófunar á kynþroska fiska en aðrar tegundir notaðar og niðurstaða fullgildingarinnar skal teljast fullnægjandi.

Atriði, sem þarf að hafa í huga í upphafi, og takmarkanir

3. Vítellógenín er yfirleitt framleitt í lifur eggbærra kvenkyns hryggdýra til að bregðast við innrænu estrógeni í blóðrásinni (2. heimild). Það er forefni eggjarauðupróta og þegar lifrin hefur framleitt það færast það með blóðrásinni í hrognasekkina þar sem hrogn eru að þroskast, taka það upp og breyta því. Nýmyndun vítellógeníns er mjög takmörkuð en þó greinanleg í óþroskuðum fiski og fullvöxnum hængum því þeir hafa ekki nóg af estrógeni í blóðrásinni. Lifrin er þó fær um að nýmynda og seyta vítellógeníni til að bregðast við útrænni estrógenörvun (3.–5. heimild).
4. Mælingar á vítellógeníni þjóna þeim tilgangi að greina íðefni með estrógen-, andestrógen- og andrógen- verkunarhætti og íðefni sem hafa áhrif á steramýndun eins og til dæmis arómatasalata. Greining á estrógenvirkum íðefnum er möguleg með því að mæla vítellógenínvirkjun í hængum og hún hefur oft verið skjalfest í ritrýndum vísindaritum. Einnig hefur verið sýnt fram á vítellógenínvirkjun í kjölfar váhrifa frá arómavirkjanlegum andrógenum (6.–7. heimild). Minnkun á magni estrógens í blóðrás kvendýra, t.d. með arómatasahömlun sem umbreytir innrænum andrógenum í náttúrulega estrógenið 17β-estradiól, veldur minnkun á styrk vítellógeníns sem er notað til að greina íðefni sem eru með arómatasahamlandi eiginleika eða steramýndunarlata á breiðari grunni (33. heimild). Líffræðilegt mikilvægi vítellógenínsvörunar í kjölfar estrógen-/arómatasahömlunar hefur

verið staðfest og víða skjalfest (8.–9. heimild). Þó er mögulegt að framleiðsla á vítellógeníni hjá kvendýrum geti einnig orðið fyrir áhrifum af almennum eiturrhifum og verkunarháttum eiturrhifa sem hafa ekki áhrif á innkirtla.

- Nokkrar mæliaðferðir hafa verið þróaðar með góðum árangri og staðlaðar til notkunar að staðaldri til að mægngreina vítellógenín í sýnum sem tekin eru úr blóði, lifur, öllum skrokknum eða jafningi úr haus/sporði einstakra fiska. Sú er raunin með sebradanna, hornsíli og japanskan rískarpa og einnig tegundina breiðkoll, sem hefur verið fullgilt að hluta; tegundarbundnar ELISA-prófunaraðferðir þar sem ónæmisfrumefnafræði er notuð til að magnákvarða vítellógenín eru tiltækar (5. og 10.–16. heimild). Í japönskum rískarpa og sebradanna er góð fylgni milli vítellógeníns sem mælist í sýnum úr blóðvökva, lifur og jafningi þó að jafningar hafi tillhneigingu til að sýna aðeins lægri gildi en blóðvökvi (17.–19. heimild). Í 5. viðbæti koma fram þær aðferðir sem mælt er með við söfnun sýna til greiningar á vítellógeníni.
- Breyting á svipfarslegu kynjahlutfalli (hlutföll kynja) er endapunktur sem endurspeglar kynskipti. Að meginreglu til geta íðefni, sem hafa hamlandi áhrif á estrógen, andestrógen, andrógen, andandrógen og steramýndun, haft áhrif á kynjahlutfall fiska sem eru að þroskast (20. heimild). Sýnt hefur verið fram á að þessi kynjaskipti geta gengið til baka að hluta til hjá sebradanna (21. heimild) eftir váhrif frá íðefnum sem líkjast estrógeni en aftur á móti eru kynskipti eftir váhrif frá íðefnum sem líkjast andrógeni varanleg (30. heimild). Kynið er skilgreint sem hrygna, hængur, millikyn (bæði eggfrumur og sæðismýndunarfrumur í einum kynkirtli) eða óaðgreint, ákvarðað hjá einstökum fiskum með vefjafræðilegri rannsókn á kynkirtlunum. Leiðbeiningar eru gefnar í 7. viðbæti og í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar „Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads“ (22. heimild).
- Erfðafræðilegt kyn er kannað með erfðamörkum þegar þau eru fyrir hendi í tiltekinni fisktegund. Í japönskum rískarpa er hægt að greina kvenkyns XX- eða karlkyns XY-litninga með kjarnsýrumögnun eða hægt er að greina Y-litningstengt gen DM-svæðis (DMY) (DMY-neikvætt eða jákvætt) eins og lýst er í 23.–24. heimild). Jafngildi kjarnsýrumögnunaraðferð til að ákvarða erfðafræðilegt kyn hjá hornsíli er lýst í 10. viðbæti. Ef hægt er að tengja erfðafræðilegt kyn einstaklingsbundið við svipfarslegt kyn eykst styrkur prófsins og af þeim sökum skal ákvarða erfðafræðilegt kyn í tegundum sem eru með skráð, erfðafræðileg kynjamerki.
- Tveir mikilvægir innkirtlaendapunktur, vítellógenín og kynjahlutfall, geta í sameiningu sýnt fram á verkunarhátt íðefnis á innkirtla (tafla 1). Kynjahlutfallið er stofntengt lífmerki (25.–26. heimild) og að því er varðar nokkra vel skilgreinda verkunarhætti er hægt að nota niðurstöður úr prófun á kynþroska fiska til að gera hættu- og áhættumat þegar eftirlitsstofnun telur það viðeigandi. Þessir verkunarhættir eru sem stendur estrógen-, andrógen- og steramýndunarlatar.

Tafla 1

Svörun innkirtlaendapunkta við mismunandi verkunarháttum íðefna

↑ = eykst, ↓ = minnkar, — = ekki rannsakað

Verkunarháttur	Vítellógenín ♂	Vítellógenín ♀	Kynjahlutfall	Heimildir
Veikur estrógenörvi	↑	↑	↑♀ eða ↑óaðgr.	(27. og 40. heimild)
Sterkur estrógenörvi	↑	↑	↑♀ eða ↑óaðgr., enginn ♂	(28. og 40. heimild)
Estrógenblokki	—	—	↓♀, ↑óaðgr.	(29. heimild)
Andrógenörvi	↓ eða —	↓ eða —	↑♂, enginn ♀	(28. og 30. heimild)
Andrógenblokki	—	—	↑♀ ↑millikyn	(31. heimild)
Arómatasalati	↓	↓	↓♀	(33. heimild)

9. Prófun á kynþroska fiska nær ekki yfir æxlunaræviskeið fisksins og þess vegna skal rannsaka iðefni, sem grunuð eru um að hafa áhrif á æxlun við lægri styrk en á kynþroska, í prófun sem nær yfir æxlun.
10. Skilgreiningar, að því er varðar þessa prófunaraðferð, eru settar fram í 1. viðbæti.
11. Prófun í lífi á kynþroska fiska er ætlað að greina iðefni með andrógen- og estrógeneiginleika sem og andandrógen-, andestrógen- og steramyndunarhamlandi eiginleika. Prófunaráfangar í prófun á kynþroska fiska (1 og 2) náðu yfir estrógen-, andrógen- og steramyndunarhamlandi iðefni. Áhrif af estrógen- og andrógenblokkum í prófun á kynþroska fiska er hægt að sjá í töflu 1 en þessir verkunarhættir eru sem stendur ekki eins rækilega skjalfestir.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

12. Í prófuninni eru fiskar látnir verða fyrir váhrifum, frá því að þeir eru nýfrjóvgað hrogn þangað til kynjaaðgreiningu er lokið, frá a.m.k. þremur styrkleikum prófunariðefnis sem er uppleyst í vatni. Prófunarskilyrðin skulu vera við gegnumstreymi nema það sé ekki mögulegt vegna tiltækileika eða eðlis (t.d. takmörkuð leysni) prófunariðefnisins. Prófunin hefst á því að nýfrjóvguð hrogn (áður en kímblöðrudiskur klofnar) eru sett í prófunarker. Hleðslu kerjanna að því er varðar hverja tegund er lýst í 27. lið. Að því er varðar fullgiltar fisktegundir, japanskan rískarpa, hornsíli og sebradanna, er prófuninni hætt á 60. degi eftir klak. Við lok prófunarinnar eru allir fiskarnir aflifaðir á mannúðlegan hátt. Tekið er líffræðilegt sýni (blóðvökvi, lifur eða jafningur úr haus/sporði) úr hverjum fiski til greiningar á vítellógeníni og hlutinn sem eftir er er festur fyrir vefjafræðilegt mat á kynkirtlum til að ákvarða svipfarslegt kyn; hægt er að gera valkvæða vefjameinafræðilega greiningu (t.d. stígsákvörðun kynkirtla, umfang millikyns). Líffræðilegt sýni (raufar- eða bakuggi) til að ákvarða erfðafræðilegt kyn er tekið úr þeim tegundum sem eru með viðkomandi merki (9. og 10. viðbætur).
13. Yfirlit yfir viðeigandi prófunarskilyrði sem eru sértæk fyrir fullgiltar tegundir: japanskan rískarpa, hornsíli og sebradanna, er að finna í 2. viðbæti.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍDEFNID

14. Niðurstöður úr prófun á bráðum eiturrhifum eða annari greiningu á skammvinnum eiturrhifum (t.d. prófunaraðferð C.14, 34. heimild) og OECD TG 210 (1. heimild), sem æskilegast er að hafi verið gerðar á þeirri tegund valin var fyrir þessa prófun, skulu vera fyrirliggjandi. Það felur í sér að leysni í vatni og gufuþrýstingur prófunariðefnisins eru þekkt og áreiðanleg greiningaraðferð, sem nota má við magngreiningu iðefnisins í prófunarkerjunum, og nákvæmni og greiningarmörk aðferðarinnar eru þekkt og tilgreind í skýrslum.
15. Aðrar gagnlegar upplýsingar eru m.a. byggingarformúlan, hreinleiki iðefnisins, stöðugleiki í vatni og birtu, pKa, P_{ow} og niðurstöður úr prófun á auðlífrjótanleika (prófunaraðferð C.4) (35. heimild).

Viðmiðanir fyrir samþykkt prófunar

16. Prófunarniðurstöður eru aðeins samþykktar ef eftirfarandi skilyrði eru uppfyllt:
 - styrkur uppleysts súrefnis skal í allri prófuninni vera a.m.k. 60% af metnunargildi lofts,
 - ekki má muna meira á vatnshitastiginu milli prófunarkerja en $\pm 1,5$ °C á hverjum tíma á váhrifatímabilinu og skal viðhalda honum innan hitasviðsins sem er tilgreint fyrir prófunartegundina (2. viðbætur),
 - fullgilt aðferð til greiningar á váhrifaíðefninu með greiningarmörk sem eru vel undir lægsta nafnstyrk skal vera tiltæk og safna skal sönnunargögnum til að sýna fram á að styrk prófunariðefnis í lausn hafi verið viðhaldið á fullnægjandi hátt innan $\pm 20\%$ af meðaltali mæligilda,

- heildarlifun frjógvaðra hrogna í samanburðarhópunum og, ef við á, í samanburði með leysi, skal vera meiri en eða jöfn þeim mörkum sem eru skilgreind í 2. viðbæti,
- samþykktarviðmiðanir, sem tengjast vexti og hlutfalli kynja við lok prófunar, byggjast á gögnum úr samanburðarhópunum (safnsýni úr samanburði með leysi og samanburði með vatni nema það sé marktækur munur á þeim, þá einungis með leysi):

		Japanskur riskarpi	Sebradanni	Hornsíli
Vöxtur	Blautvigt fisks, þerraður	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Lengd (staðallengd)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Kynjahlutfall (% hængar eða hrygnur)		30–70%	30–70%	30–70%

- Þegar leysir er notaður skal hann ekki hafa nein tölfræðilega marktæk áhrif á lifun og skal ekki kalla fram nein innkirtlatruflandi áhrif eða önnur skaðleg áhrif á fyrstu æviskeiðin og það skal kannað með samanburðarprófun með leysi.

Ef frávik frá samþykktarviðmiðunum prófunarinnar koma fram skal athuga afleiðingarnar í tengslum við áreiðanleika prófunargagnanna og þessar athuganir skulu koma fram í skýrslugjöfni.

LÝSING Á PRÓFUNARADFERÐINNI

Prófunarker

17. Nota má ker úr gleri, ryðfríu stáli eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Kerin skulu vera svo stór að unnt sé að uppfylla viðmiðanir um hleðsluhlutfall sem koma fram hér á eftir. Æskilegt er að prófunarkerjunum sé komið fyrir af handahófi á prófunarsvæðinu. Handahófskennd tilhögun með hópa af prófunarkerum, þar sem hver styrkleiki er fyrir hendi í hverjum hóp, er æskilegri en algerlega handahófskennd tilhögun. Prófunarkerin skulu varin gegn óæskilegri truflun.

Val á tegund

18. Í 2. viðbæti eru tilgreindar fisktegundir sem mælt er með. Verkerli til að fella nýjar tegundir inn er að finna í 2. lið.

Eldi klakfisks

19. Upplýsingar um eldi klakfisks við fullnægjandi skilyrði er að finna í OECD TG 210 (1. heimild). Fóðra skal klakfisk einu sinni eða tvisvar á dag með viðeigandi fóðri.

Meðhöndlun fósturvísa og seiða

20. Í upphafi má láta fósturvísana og seiðin verða fyrir váhrifum í smáum kerjum úr gleri eða ryðfríu stáli sem eru með möskva á hliðum eða endum og komið fyrir í meginkerinu þannig að prófunaríðefnið geti streymt um þau. Framkalla má iðulaust streymi gegnum þessi smáu ker með því að hengja þau upp í arm sem komið er fyrir og hreyfir kerin upp og niður en þannig að lífverurnar eru ávallt í kafi.
21. Ef hrognin hafa verið sett í hrognaker, á grindur eða möskva í meginprófunarkerinu skulu þessir tálmar teknir í burtu eftir klak seiðanna (13. heimild) en möskvunum skal þó haldið til að varna því að fiskurinn sleppi. Ef nauðsynlegt er að flytja seiðin skal þess gætt að loft leiki ekki um þau og ekki má nota net til að færa seiði úr hrognakerum. Tímasetning þessa flutnings ræðst af tegundinni og ekki er víst að koma þurfi til flutnings.

Vatn

22. Allt vatn, þar sem prófunartegundin sýnir a.m.k. sömu lifun í samanburðarhópum og í vatni sem lýst er í 3. viðbæti, hentar sem prófunarvatn. Gæði vatnsins skulu vera stöðug allan prófunartímann. Til að tryggja að þynningarvatnið hafi ekki óæskileg áhrif á niðurstöður prófunarinnar (t.d. með því að hvarfast við prófunariðefnið), eða að það hafi ekki skaðleg áhrif á undaneldisstofninn, skal taka sýni til greiningar með reglulegu millibili. Mæla skal heildarmagn lífræns kolefnis, eðlisleiðni, sýrustig og svifagnir, t.d. þriðja hvern mánuð ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Mælingar skulu gerðar á þungmálum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), helstu plúsjónum og mínusjónum (t.d. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) og varnarefnum ef vafi leikur á um vatnsgæðin. Upplýsingar um efnagreiningu og vatnsöflun er að finna í 34. lið.

Prófunarlausnir

23. Nota skal gegnumstreymiskerfi ef það er gerlegt. Við gegnumstreymisprófun er nauðsynlegt að nota kerfi sem skammtar stöðugt stofnlausn með prófunariðefninu og þynnir hana (t.d. skammtadælu, hlutfallsþynningarbúnað og mettunarkerfi) og flytur raðir styrkleika í prófunarkerin. Kanna skal streymi stofnlausna og þynningarvatns reglulega alla prófunina og í allri prófuninni skal frávik í streyminu ekki vera meira en 10%. Reynslan sýnir að streymi, sem jafngildir a.m.k. rúmmáli fimm prófunarkera á 24 klukkustundum, er hæfilegt (1. heimild). Þess skal gætt að forðast notkun á plastslöngum eða öðru efni sem gæti innihaldið líffræðilega virk iðefni eða ásogað prófunariðefnið.
24. Heppilegast er að tilreiða stofnlausnina án þess að nota leysa með því að prófunariðefninu sé einfaldlega blandað, eða það sé hrist, saman við þynningarvatnið á vélrænan hátt (t.d. með hræri- eða úthljóðsbúnaði). Ef erfitt er að leysa prófunariðefni upp í vatni skal fylgja verkferlum sem lýst er í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir á eiturhrifum iðefna og blandna, sem erfitt er að gera prófanir á, í vatni (e. *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (36. heimild). Forðast skal notkun leysa en það kann þó að vera nauðsynlegt í tilteknum tilvikum til að fá stofnlausn af hæfilegum styrkleika. Dæmi um heppilega leysa er að finna í 36. heimild.
25. Forðast skal prófanir við hálfkyrrstöðuskilyrði nema lagður sé fram rökstuðningur fyrir knýjandi ástæðum sem tengjast prófunariðefninu (t.d. stöðugleiki, takmarkað framboð, mikill kostnaður eða hætta). Að því er varðar hálfkyrrstöðutækni er hægt að fylgja tveimur mismunandi aðferðum við endurnýjun. Annað hvort eru nýjar prófunarlausnir tilreiddar í hreinum kerjum og lifandi hrogn og seiði flutt varlega í nýju kerin eða prófunarlífverunum haldið í prófunarkerjunum en skipt um hluta (a.m.k. tvo þriðju) af prófunarvatninu daglega.

VERKFERLI**Váhrifaskilyrði***Söfnun hrogna og tímalengd*

26. Til að komast hjá erfðafræðilegri bjögum er hrognunum safnað frá a.m.k. þremur undaneldispörum eða -hópum sem er blandað saman og valið úr af handahófi til að hefja prófunina. Að því er varðar hornsíli; sjá lýsingu á tæknifrjögum í 11. viðbæti, Prófunin skal hefjast eins fljótt og unnt er eftir að hrognin hafa frjögast, seiðin eiga helst að vera á kafi í prófunarlausnunum áður en klofnun kimblöðrudisksins lýkur, eða eins fljótt og auðið er eftir þetta stig og eigi síðar en 12 klst. eftir frjögum. Prófunin skal halda áfram þangað til kynjaaðgreiningu í samanburðarhópnum er lokið (60 dögum eftir klak að því er varðar japanskan riskarpa, hornsíli og sebradanna).

Hleðsla

27. Fjöldi frjöggaðra hrogna við upphaf prófunar skal vera a.m.k. 120 á hvern styrk, skipt á milli a.m.k. 4 samhliða prófana (skipting í samanburðarhópa út frá kvaðratrót (e. *square root allocation*) er samþykkt). Hrognin skulu dreifast handahófskennt (með því að nota tölfræðilegar töflur til slembiröðunar) á meðhöndlunarhópna. Hleðsluhlutfallið (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti) skal ekki vera stærra en svo að styrkur uppleysts súrefnis haldist við a.m.k. 60% af mettunargildi lofts án beinnar loftunar kerjanna. Í gegnumstreymisprófunum er mælt með því að hleðsluhlutfallið fari ekki yfir 0,5 g/l á 24 klukkustundum og ekki undir neinum kringumstæðum yfir 5 g/l lausnar. Eigi síðar en 28 dögum eftir frjögum skal fiskafjöldanum í hverju kerri samhliða prófunar dreift upp á nýtt þannig að fjöldinn í hverju kerri samhliða prófunar sé sem næst því að vera sá sami. Ef váhrifatengd afföll verða skal fækka samhliða prófunum eins og við á þannig að þéttleiki fiska milli meðhöndlunarstiga sé eins jafn og unnt er.

Ljós og hiti

28. Haga skal ljóslotum og vatnshitastigi þannig að henti þeirri tegund sem er prófuð (sjá 2. viðbæti varðandi tilraunaskilyrði fyrir prófun á kynþroska fiska).

Fóðrun

29. Fóður og fóðrun skipta miklu máli og mikilvægt er að rétt fóður fyrir hvert stig sé gefið með hæfilegu millibili og í magni sem nægir til að styðja eðlilegan vöxt. Fóður skal látið í té að vild en offramboði um leið haldið í lágmarki. Til að ná nægilegum vaxtarhraða skal fýðra fiskana a.m.k. tvisvar á dag (um helgar má gefa einu sinni á dag) með minnst 3 klst. millibili. Fjarlægja skal umframfóður og saur eftir þörfum til að komast hjá uppsöfnun úrgangs. Eftir því sem reynsla fæst eru sífellt gerðar endurbætur á fóður- og fóðrunarfyrirkomulagi til að bæta lifun og hámarka vöxt. Þess vegna skal leitast við að staðfesta tillagt fyrirkomulag við viðurkennda sérfræðinga. Ekki skal gefa fóður í sólarhring áður en prófun lýkur. Dæmi um viðeigandi fóður eru tilgreind í 2. viðbæti (sjá einnig „OECD Fish Testing Framework“, 39. heimild).

Prófunarstyrkleikar

30. Prófunaríðefnin skulu vera með þá dreifingu sem lýst er í 4. viðbæti. Nota skal a.m.k. þrjá prófunarstyrkleika í a.m.k. fjórum samhlíða prófunum. Taka skal mið af ferli LC₅₀ á móti váhrifatímabili í tiltækum prófunum á bráðum eiturhrifum þegar styrkleikasviðið er ákveðið. Mælt er með fimm prófunarstyrkleikum ef nota á gögnin til að gera áhættumat.
31. Ekki er nauðsynlegt að prófa íðefni við styrkleika sem er meiri en 10% af bráðu LC₅₀-gildi fyrir fullvaxin dýr eða 10 mg/l, eftir því hvor er minni. Hámarksprófunarstyrkur skal vera 10% af LC₅₀ fyrir seiða-/ungfiskalífserlið.

Samanburðarprófanir

32. Keyra skal samanburðarprófun með þynningarvatni (≥ 4 samhlíða prófanir) og, ef við á, samanburðarprófun með leysi (≥ 4 samhlíða prófanir) til viðbótar við prófunarstyrkleikana. Einungis skal nota leysa, sem hafa verið rannsakaðir og sýnt fram á að hafi ekki tölfærðilega marktæk áhrif á endapunkta prófunarinnar, í prófuninni.
33. Þegar leysir er notaður skal lokastyrkur hans ekki vera hærri en 0,1 ml/l (36. heimild) og nota skal sama styrk í öllum prófunarkerjum nema í samanburðarkerjum með þynningarvatni. Þó skal forðast notkun slíkra efna í lengstu lög eða halda styrk leysis í lágmarki.

Tíðni magngreininga og mælinga

34. Framkvæma skal efnagreiningu á styrk prófunaríðefnis áður en prófun hefst til að kanna hvort samþykktarviðmiðunum er fylgt. Gera skal greiningu á hverri samhlíða prófun fyrir sig við upphaf og lok prófunar. Gera skal greiningu á einni samhlíða prófun á hvern prófunarstyrkleika a.m.k. einu sinni í viku meðan prófunin stendur yfir og skipta kerfisbundið milli samhlíða prófananna (1,2,3,4,1,2...). Ef sýni eru geymd til greiningar síðar meir skal áður fullgilda aðferðir við geymslu sýnanna. Sýni skulu síuð (t.d. með síu með opstærðinni 0,45 µm) eða skilin í skilvindu til að tryggja að ákvarðanir séu gerðar á íðefninu í eiginlegu lausninni.
35. Meðan prófunin stendur yfir skal mæla uppleyst súrefni, sýrustig, heildarhörku, eðlisleiðni, seltu (ef við á) og hita í öllum prófunarkerjum. Að lágmarki skal mæla uppleyst súrefni, seltu (ef við á) og hitastig vikulega og sýrustig, eðlisleiðni og hörku við upphaf og lok prófunarinnar. Æskilegt er að vakta hitastigið stöðugt í a.m.k. einu prófunarkeri.
36. Niðurstöður skulu byggjast á mældum styrk. Ef styrk prófunarefnis í lausn hefur verið haldið á fullnægjandi hátt innan ± 20% af nafnstyrk í allri prófuninni mega þó niðurstöðurnar annað hvort grundvallast á nafngildi eða mældu gildi.

Athuganir og mælingar*Stig fósturvísisþroskunar*

37. Váhrifin skulu hefjast eins fljótt og unnt er eftir frjóvgun og áður en klofnun kímblöðrudisks hefst og eigi síðar en 12 klst. eftir frjóvgun til að tryggja váhrif meðan fósturvísisþroskun á fyrstu stigum stendur yfir.

Klak og lifun

38. Athuganir á klaki og lifun skulu gerðar a.m.k. daglega og niðurstöður skráðar. Fjarlægja skal dauða fósturvísa, seiði og ungfiska um leið og eftir þeim er tekið þar eð þau geta sundrast hratt og hlutast í sundur vegna atferlis annarra fiska. Ítrustu varúðar skal gætt þegar dauðir fósturvísar eða seiði eru fjarlægð til að rekast ekki í eða skaða nálæg hrogn eða seiði því að þau eru einstaklega fingerð og viðkvæm. Viðmiðanir fyrir dauða eru breytileg eftir stigi lífsferils:

- hrogn: greinileg minnkun á gagnsæi og litarbreyting, einkum á fyrstu stigum, sem orsakast af kekkjun og/ eða útfellingu prótína og veldur því að þau verða hvít og ógagnsæ,
- seiði og ungfiskur: hreyfingarleysi og/eða engar öndunarhreyfingar og/eða enginn hjartsláttur og/eða hvít og ógagnsæ litaráferð miðtaugakerfisins og/eða engin viðbrögð við líkamlegu áreiti.

Óeðlilegt útlit

39. Skrá skal fjölda seiða eða fiska með afbrigðilega skrokkgerð og lýsa útliti og eðli afbrigðileikans. Hafa skal í huga að afbrigðilegir fósturvísar og seiði koma fyrir í náttúrunni og geta verið allmargir hundradshlutar í samanburðarhópi eða hópum hjá sumum tegundum. Afbrigðileg dýr skulu eingöngu fjarlægð úr prófunarkerjum eftir dauða þeirra. Í samræmi við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/63/ESB frá 22. september 2010 um vernd dýra sem eru notuð í vísindaskyni skal þó, ef afbrigðileikinn veldur sársauka, þjáningu og hræðslu eða varanlegum skaða og hægt er að segja með vissu til um dauða þeirra, svæfa og aflífa dýrin í samræmi við lýsinguna í 44. lið og meðhöndla það sem dauðsföll í gagnagreiningunni.

Óeðlilegt atferli

40. Afbrigðileiki, t.d. oföndun, ósamstillt sund, ódæmigerð ró og óeðlilegt atferli við fôðurát, skal skráður þegar hann kemur fram.

Þyngd

41. Við lok prófunar skal aflífa alla eftirlifandi fiska (svæfa þá ef taka á blóðsýni) og veга blautvigt (þerraðir) hvers og eins.

Lengd

42. Við lok prófunar skal mæla lengd hvers einstaklings (staðallengd).
43. Með þessum athugunum verða sum eða öll eftirfarandi gögn tiltæk til skýrslugjafar:

- uppsöfnuð afföll,
- fjöldi heilbrigðra fiska í lok prófunar,
- tímamunktur þegar klak hófst og þegar því lauk,
- lengd og þyngd eftirlifandi dýra,
- fjöldi vanskapaðra seiða,
- fjöldi fiska sem sýnir afbrigðilegt atferli.

Sýnataka úr fiski

44. Sýnataka úr fiskum fer fram þegar prófun er hætt. Fiska, sem sýnir er tekið úr, skal aflifa með t.d. MS-222 (100–500 mg á hvern l jafnað með 200 mg NaHCO₃ á hvern l) eða FA-100 (4-allyl-2-metoxýfenól: evgenól) og mæla hvern um sig og vega sem blautvigt (þerraður) eða svæfa ef taka á blóðsýni (sjá 49. lið).

Sýnataka til greiningar á vítellógeníni og ákvörðun á kyni með vefjafræðilegu mati

45. Taka skal sýni úr öllum fiskum og undirbúa þá fyrir greiningu á kyni og vítellógeníni. Gera skal vefjafræðilega greiningu á öllum fiskum til að ákvarða kyn. Að því er varðar mælingar á vítellógeníni telst viðunandi að taka undirsýni úr a.m.k. 16 fiskum úr hverri samhlíða prófun. Greina skal fleiri fiska m.t.t. vítellógenins ef niðurstöður úr undirsýnatöku reynast óljósar.
46. Aðferð við sýnatöku til að greina vítellógenín og ákvarða kyn fer eftir aðferðinni við vítellógeníngreininguna:

Aðferð til greiningar á vítellógeníni í haus-/sporðjafningi

47. Fiskurinn er aflifaður. Haus og sporður á hverjum fiski eru skornir frá búknum með skurðarhnífi rétt fyrir aftan eyruggana og rétt fyrir aftan bakuggann (sjá mynd 1). Haus- og sporðhluti af hverjum fiski eru settir í safnsýni, vegnir og númeraðir hvor fyrir sig, frystir í fljótandi köfnunarefni og geymdir við – 70° eða lægra hitastig til greiningar á vítellógeníni. Bolhluti fisksins er númeraður og festur í viðeigandi festiefni til vefjafræðilegs mats (22. heimild). Með því að nota þessa aðferð eru vítellógenín og vefjameinafræði metin hjá hverjum einstaklingi og þannig er hægt að tengja hugsanlegar breytingar á vítellógenínmagni við svipfarslegt kyn fisksins eða erfðafræðilegt kyn (japanskur riskarpi og hornsíli) fisksins. Sjá frekari upplýsingar í leiðbeiningum um jafnblöndun (5. viðbætur) og leiðbeiningum um magnákvörðun á vítellógeníni (6. viðauki).

Aðferð til greiningar á vítellógeníni í lifrarjafningi

48. Fiskurinn er aflifaður. Lifrin er skorin úr og geymd við – 70° eða lægra hitastig. Aðferðir sem mælt er með til að skera lifrina úr og við formeðhöndlun eru tiltækar í OECD TG 229 (37. heimild) eða í kafla C.37 í þessum viðauka (38. heimild). Síðan eru lifrarnar jafnblandaðar hver um sig eins og lýst er í OECD TG 229 eða í kafla C.37 í þessum viðauka. Flotið, sem er safnað, er notað til að mæla vítellógenín með radkvæmri ELISA-tækni (sjá dæmi um magnákvörðun í sebradanna í 6. viðbæti eða OECD TG 229 (37. heimild) að því er varðar japanskan riskarpi. Með því að fylgja þessari aðferð er einnig mögulegt að fá gögn um einstaka fiska, bæði að því er varðar vítellógenín og vefjafræðilega rannsókn á kynkirtlum.

Aðferð til greiningar á vítellógeníni í blóðvökva

49. Blóði er safnað úr svæfðum fiski með ástungu í hjartað, sporðblæð eða með því að skera í sporðinn og skilið í skilvindu við 4 °C til blóðvökvasöfnunar. Blóðvökvinn er geymdur við – 70° eða lægra hitastig uns hann er notaður. Fiskurinn er aflifaður og festur fyrir vefjafræðilega rannsókn. Bæði blóðvökvasýnin og fiskarnir eru númeruð hvert fyrir sig til að tengja vítellógeníngildi við kyn fisksins.

*Mynd 1***Hvernig skera skal fisk til að mæla vítellógenín í jafningi úr haus/sporði og vefjafræðilegu mati á miðhlutanum**

Skorið er aftan við bakuggann

Skorið er aftan við eyruggann

Ákvörðun á erfðafræðilegu kyni

50. Líffræðilegt sýni til að ákvarða erfðafræðilegt kyn er tekið úr hverjum fiski fyrir sig af þeim tegundum sem eru með viðkomandi merki. Að því er varðar japanskan rískarpa er raufarugginn eða bakugginn tekinn. Nákvæma lýsingu er að finna í 9. viðbæti, þ.m.t. sýnataka úr vef og ákvörðun á kyni með kjarnsýrumögnunaraðferð. Á sama hátt, að því er varðar hornsíli, er að finna lýsingu í 10. viðbæti á sýnatöku úr vef og ákvörðun á kyni með kjarnsýrumögnunaraðferð.

Mælingar á vítellógeníni

51. Mælingar á vítellógeníni skulu byggjast á megindlegri og greiningarlega fullgilti aðferð. Upplýsingar skulu liggja fyrir um breytileika aðferðar, sem notuð er á tiltekinni rannsóknarstofu, innan rannsóknarstofu og milli rannsóknarstofa. Uppspretta breytileika milli rannsóknarstofa og innan þeirra er (líklegast) byggð á mismunandi þroskastigum fiskistofnsins. Að teknu tilliti til breytileika vítellógenímælinga skal styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif, sem er byggður á þessum endapunkti einum og sér, meðhöndlaður af mikilli varkárni. Mismunandi aðferðir eru tiltækar til að meta vítellógenínframleiðslu í þeim fisktegundum sem teknar eru til athugunar í þessari greiningu. Mælitækni, sem er bæði hlutfallslega næm og sértæk, er að ákvarða prótínstyrk með ELISA-prófun. Nota skal raðkvæm mótefni (sem myndast gegn vítellógeníni í sömu tegund) og mikilvægustu raðkvæmu staðlana.

Ákvörðun á kyni

52. Heill fiskur eða miðhlutinn sem eftir er af hverjum fiski, allt eftir aðferð við sýnatöku til að greina vítellógenín, er settur í formerkt hylki fyrir meðhöndlunina (e. *processing cassette*) og fest í viðeigandi festiefni til vefjafræðilegrar ákvörðunar á kyni (einnig valkvætt til að meta stígsákvörðun kynkirtla). Leiðbeiningar um festingu og innsteypingu eru gefnar í 7. viðbæti sem og í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar „Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads“ (22. heimild). Eftir meðhöndlun eru fiskarnir steyptir í paraffínblökk. Leggja skal hvern fisk fyrir sig langsum í paraffínblökkina. Að minnsta kosti sex langskornar sneiðar (3-5 µm á þykkt) í breiðskurði, þ.m.t. kynkirtlavefur úr báðum kynkirtlum, eru teknar úr hverjum einstaklingi. Bilið milli þessara sneiða skal vera u.þ.b. 50 µm hjá hængum og 250 µm hjá hrygnum. Þar eð hver blokk inniheldur oft bæði hænga og hrygnur (ef fleiri en einn einstaklingur er steypdur í hverja blokk) skal þó bilið milli sneiða úr þessum blökkum vera u.þ.b. 50 µm þangað til búið er að ná a.m.k. sex sneiðum af kynkirtlunum úr hverjum hæng. Eftir það má auka bilið milli sneiða í u.þ.b. 250 µm hjá hrygnum. Sneiðarnar eru litaðar með hematoxýlíni og eosíni og skoðaðar með ljósmásjárrannsókn með megináherslu á kyn (hrygna, hængur, millikyn eða óaðgreindir). Millikyn er skilgreint þannig að fyrir hendi séu fleiri en ein eggfruma í svilum á hverjar sex sneiðar sem eru greindar eða sæðismyndunarfrumur (já/nei) í hrognasekkjum. Vefjameinafræðileg rannsókn og stígsákvörðun á hrognasekkjum og svilum er valkvæð en ef það er rannsakað skal gera tölfraðilega greiningu á niðurstöðunum og greina frá þeim. Hafa skal í huga að sumar fisktegundir skortir fullþroskað kynkirtlapar frá náttúrunnar hendi og e.t.v. er einungis einn kynkirtill fyrir hendi (t.d. í japönskum rískarpa og einstaka sinnum í sebradanna). Allar slíkar athuganir skulu skráðar.
53. Ákvörðun á erfðafræðilegu kyni einstakra japanskra rískarpa byggist á því hvort Y-litningstengt gen DMY-svæðis (DMY), sem ákvarðar karlkyn rískarpan, sem er staðsett á Y-litningnum, er fyrir hendi eða ekki. Hægt er að greina kynarfgerð rískarpan með því að raðgreina DMY-gen sem er dregið út úr deoxýríbósakjarnsýru (DNA), t.d. úr hluta af raufarugga eða bakugga. Ef DMY-gen er fyrir hendi bendir það til XY (karlkyns) einstaklings, óháð svipfari, en ef DMY-gen er ekki fyrir hendi bendir það til XX (kvenkyns) einstaklings, óháð svipfari (23. heimild). Leiðbeiningar um undirbúning vefja og kjarnsýrumögnunaraðferð er að finna í 9. viðauka. Ákvörðun á erfðafræðilegu kyni einstakra hornsíla er einnig framkvæmd með kjarnsýrumögnunaraðferð sem lýst er í 10. viðbæti.
54. Gera skal grein fyrir tilvikum millikyns (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti).

Annars stígs kyneinkenni

55. Annars stígs kyneinkenni stjórnast af innkirtlum í tegundum á borð við japanskan rískarpa; þess vegna skal gera athuganir á útliti fisksins við lok váhrifanna, ef unnt er. Í japanska rískarpanum eru toturnar sem myndast á afturhluta raufaruggans hjá hrygnum næmar fyrir andrógeni. Í kafla C.37 í þessum viðauka (38. heimild) eru viðeigandi ljósmyndir af annars stígs kyneinkennum hænga og andrógenörvaðra (e. *androgenised*) hrygna.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF*Úrvinnsla niðurstaðna*

56. Mikilvægt er að öflugasta, gilda tölfræðilega prófið ákvarði endapunktinn. Samhliða prófunin er tilraunaæiningin en breytileiki milli samhliða prófana skal tekinn með í tölfræðilega prófinu. Í 8. viðbæti er að finna ákvörðunarflæðirit til aðstoðar við að finna hentugasta tölfræðilega prófið sem á að nota á grundvelli eiginleika gagnanna sem fást úr prófuninni. Gildi tölfræðilegrar marktækni er 0,05 fyrir alla endapunkta sem teknir eru með.

Hlutfall kynja og erfðafræðilegra kynja

57. Gera skal greiningu á hlutfalli kynja m.t.t. marktækra áhrifa (styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC)/minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC)) af váhrifum með Jonckheere-Terpstra (leitniþrófun) ef einhalla skammtasvörun er fyrir hendi. Ef svörun er ekki einhalla skal nota paraða prófun: Nota skal Dunnetts-próf ef hægt er að ná fram normleika og einsleitni dreifni. Nota skal Tamhane-Dunnnett ef misleitni dreifni er fyrir hendi. Annars skal nota Mann-Whitney-próf með Bonferroni-Holm-aðlögun. Flæðirit með lýsingu á tölfræðilegum upplýsingum um hlutfall kynja er að finna í 8. viðbæti. Hlutfall kynja skal sett fram í töflum sem styrkhlutföll \pm staðalfrávik (SF) fyrir hænga, hrygnur, millikyn og óaðgreinda. Leggja skal áherslu á tölfræðilega marktækni. Dæmi eru kynnt í fullgildingarskýrslu um prófun á kynþroska fiska, 2. áfanga (42. heimild). Erfðafræðilegt kyn skal gefið upp sem hundraðshluti af svipfarslegum kynskiptum hjá hængum, hrygnum, millikyni eða óaðgreindum.

Styrkleikar vítellógeníns

58. Gera skal greiningu á styrkleikum vítellógeníns m.t.t. marktækra áhrifa (styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif)/minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif) af váhrifum. Dunnetts-próf er æskilegast í t-prófuninni með Bonferroni-leiðréttingu. Ef Bonferroni-leiðrétting er notuð er Bonferroni-Holm-leiðrétting æskilegust. Gera skal ráð fyrir lograðri vörpun vegna vítellógeníns til að fá fram normleika og einsleitni dreifni. Ef styrkháð svörun er í samræmi við einhalla svörun eftir það er Jonckheere-Terpstra-próf æskilegra en eitthvað af ofangreindu. Ef t-próf eða Dunnetts-próf er notað er ekki þörf á F-marktækniþrófi í dreifnigreiningu til að halda áfram. Sjá nánari upplýsingar í flæðiritinu í 8. viðbæti. Setja skal niðurstöðurnar fram í töflum sem styrkmeðaltal \pm staðalfrávik (SF) fyrir hænga, hrygnur, millikyn og óaðgreinda, hvert fyrir sig. Leggja skal áherslu á tölfræðilega marktækni að því er varðar svipfarslegar hrygnur og svipfarslega hænga. Dæmi eru kynnt í fullgildingarskýrslu um prófun á kynþroska fiska, 2. áfanga (42. heimild).

Prófunaríðefni: raunstyrkleikar

59. Raunstyrkleikar prófunaríðefnisins í kerjunum skulu greindir með þeirri tíðni sem lýst er í 34. lið. Setja skal niðurstöðurnar fram í töflum sem styrkmeðaltal \pm staðalfrávik (SF) á grundvelli samhliða prófana og á grundvelli styrks með áherslu á upplýsingar um fjölda sýna og með einfara sem víkja frá meðaltali meðhöndlunarstyrkleika \pm 20%. Dæmi um slíkt er að finna í fullgildingarskýrslu um prófun á kynþroska fiska, 2. áfanga (42. heimild).

Túlkun niðurstaðna

60. Niðurstöðurnar skulu túlkaðar með varúð ef mældir styrkleikar prófunaríðefnisins í prófunarlausnunum eru nálægt greiningarmörkum greiningaraðferðarinnar.

Prófunarskýrsla

61. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni

- eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli; efnafræðileg sanngreiningargögn, þ.m.t. hreinleiki og greiningaraðferð til að magnákvæða prófunaríðefnið.

Prófunarskilyrði

- Prófunaraðferð sem er notuð (t.d. gegnumstreymi, hálfkyrrstaða/endurnýjun); tilhögun prófunar þ.m.t. prófunarstyrkleikar, aðferð við tilreiðslu stofnlausna (í viðauka), tíðni endurnýjunar (tilgreina skal uppleysandi efni og styrk þess, þegar það er notað),
- nafnstyrkleikar í prófuninni, meðaltal mældra gilda og staðalfrávik þeirra í prófunarkerjunum og sú aðferð sem er notuð til að fá þessi gildi (tilgreina skal greiningaraðferðina sem er notuð í viðauka) og gögn sem sýna að mælingarnar vísi til raunverulegra styrkleika prófunarefnisins í eiginlegu lausninni,
- gæði vatns í prófunarkerjum; sýrustig, harka, hitastig og styrkur uppleysts súrefnis,
- ítarlegar upplýsingar um fóðrun (t.d. tegund fóðurs, uppruni, magn sem er gefið og tíðni og greining á aðskotæfnum (t.d. fjöklóruð bifenyli, fjölhringa, arómatísk vettiskolefni og klórlífræn varnarefni), ef það skiptir máli.

Niðurstöður

- gögn sem sýna að samanburðarprófanir uppfylli gildisviðmiðanir: gögn um klakhraða skulu sett fram í töflum sem hundraðshluti af hverri samhlíða prófun og af hverjum styrk. Leggja skal áherslu á einfara út fyrir samþykktarviðmiðun (í samanburði). Lífun skal sett fram sem hundraðshluti af hverri samhlíða prófun og af hverjum styrk. Leggja skal áherslu á einfara út fyrir gildisviðmiðanirnar (í samanburði),
 - greinilegar vísbendingar um niðurstöður sem fengust úr mismunandi endapunktum sem voru athugaðir: lífun fósturvísa; og árangur í klaki; ytri afbrigðileiki, lengd og þyngd; mælingar á vitellogéníni (ng/g jafnings, ng/ml blóðvökva eða ng/mg lifrar); vefjafræðileg rannsókn á kynkirtlum; kynjahlutfall; gögn um erfðafræðilegt kyn; öll tilvik fiska sem sýndu óvenjulega svörun og öll sýnileg áhrif sem prófunariðefnið kallaði fram.
62. Setja skal niðurstöðurnar fram sem meðalgildi \pm staðalfrávik (SF) eða staðalskekkju (SS). Gera skal grein fyrir tölfræðilegum upplýsingum a.m.k. sem styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif, minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og öryggisbili Fylgja skal tölfræðilega flæðiritinu (8 viðbætur).

HEIMILDIR

- 1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- 2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 194-202.
- 3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, "Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", *Environmental Health Perspectives* 103, pp. 173-178.
- 4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), "An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin", *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, pp. 337-347.
- 5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), "Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, pp. 119-131.
- 6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), "Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disruptors", *Fish Physiology and Biochemistry* 28, pp. 319-321.
- 7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), "Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", *Aquatic Toxicology* 65, pp. 397-411.

- 8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), "Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 319-326.
- 9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), "Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 533-541.
- 10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V. Sullivan (1999), "Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, pp. 113-125.
- 11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), "Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 1699-1708.
- 12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), "Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, pp. 161-169.
- 13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), "The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", *Aquatic Toxicology* 70, pp. 311-326.
- 14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), "Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", *Journal of Health Science* 50, pp. 301-308.
- 15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), "Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*", 78, pp. 202-206.
- 16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), "Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, pp. 101-105.
- 17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), "Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597*, pp. 48-51.
- 18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), "Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, pp. 621-633.
- 19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), "Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 237-243.
- 20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), "Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, *Sexual Development* 3", pp. 136-151.
- 21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), "An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*", *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, pp. 1088-1098.
- 22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.
- 23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), "Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*", *Developmental Dynamics* 231, pp. 518-526.

- 24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), "Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations", *Zoological Science* 21, pp. 613-619.
- 25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), "Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 8897-8901.
- 26) Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), "Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethinylestradiol added to a whole lake", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, pp. 1920-1935.
- 27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), "Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Aquatic Toxicology* 77, pp. 279-290.
- 28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), "Detection of endocrine disruptors: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, pp. 57-66.
- 29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), "Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disruptors: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)", *Fish Physiology and Biochemistry* 30, pp. 257-266.
- 30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), "Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", *Aquatic Toxicology* 98, pp. 336-343.
- 31) Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), "Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)", *Aquatic Toxicology* 63, pp. 391-403.
- 32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), "Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development", *Aquatic Toxicology* 70, pp. 11-21.
- 33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), "Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 165-170.
- 34) Kafli C.14 í þessum viðauka, Vaxtarprófun á ungfiski.
- 35) Kafli C.4 í þessum viðauka, Ákvörðun á auðlífbrjótanleika.
- 36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- 37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- 38) Kafli C.37 í þessum viðauka, rannsókn á fiskum í 21 dag: skammtímaskimun fyrir estrógen- og andrógenvirkni og arómatasahömlun.
- 39) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris
- 40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), "Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*" *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10 pp 768-779.
- 41) OECD (2011), *Validation Report (Phase I) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

- 42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.
 - 43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.
 - 44) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/63/ESB frá 22. september 2010 um vernd dýra sem eru notuð í vísindaskyni. Stjttíð. ESB L 276, 20.10.2010, bls. 33.
-

*I. viðbætur***Skammstafanir og skilgreiningar**

Endapunktur: Veldur áhrifum á stofninn

Mettunargildi lofts (ASV): Mettunargildi lofts

Lífmerki: Veldur áhrifum á einstaklinga

Íðefni: Efni eða blanda.

Dagar eftir klak (Dph): Dagar eftir klak

Y-litningstengt gen DM-svæðis (DMY): Y-sértækt gen DM-svæðis sem þörf er á til karlþroska í rískörpum.

ELISA: ELISA-prófun

Þyngd fisks: Blautvigt fisks (þerraður)

Prófun á kynþroska fiska (FSDT): Prófun á kynþroska fiska

Undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaðxull (HPG): Undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaðxull

Fiskur af millikyni: Fiskur, sem er með fleiri en eina eggfrumu í kynkirtli (svilum) á hverjar sex sneiðar sem eru greindar eða sæðismyndunarfrumur í hrognasekkjum (já/nei)

Hleðsluhlutfall: Blautvigt fiska miðað við rúmmál vatns

Verkunarháttur: Verkunarháttur

Víxlritakjarnsýrumögnun (RT-PCR): Víxlritakjarnsýrumögnun

Prófunariðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Óaðgreindir fiskar: Fiskar með kynkirtla sem eru ekki með sýnilegar kímfrumur

Vitellógenín (VTG): Vitellógenín

2. viðbætur

Tilraunaskilyrði fyrir prófun á kynþroska fiska (ferskvatnstegundir)

1. Ráðlagðar tegundir	Japanskur rískarpi (<i>Oryzias latipes</i>)	Sebradanni (<i>Danio rerio</i>)	Hornsíli (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Tegund prófunar	Gegnumstreymi eða hálfkyrrestaða	Gegnumstreymi eða hálfkyrrestaða	Gegnumstreymi eða hálfkyrrestaða
3. Vatnshitastig	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Lýsing	Flúrperur (breitt róf)	Flúrperur (breitt róf)	Flúrperur (breitt róf)
5. Ljósstyrkur	10–20 µE/m ² /s, 540–1080 lux eða 50–100 ft-c (í rannsóknarstofu umhverfinu)	10–20 µE/m ² /s, 540–1080 lux eða 50–100 ft-c (í rannsóknarstofu umhverfinu)	10–20 µE/m ² /s, 540–1080 lux eða 50–100 ft-c (í rannsóknarstofu umhverfinu)
6. Ljóslofta	Birta í 12–16 klst., myrkur í 8–12 klst.	Birta í 12–16 klst., myrkur í 8–12 klst.	Birta í 16 klst., myrkur í 8 klst.
7. Lágmarksstærð kerja	Hvert ker skal innihalda vatnsmagn sem nemur a.m.k. 7 l	Hvert ker skal innihalda vatnsmagn sem nemur a.m.k. 7 l	Hvert ker skal innihalda vatnsmagn sem nemur a.m.k. 7 l
8. Rúmmálsútskipti prófunarlausna	Að lágmarki 5 á dag	Að lágmarki 5 á dag	Að lágmarki 5 á dag
9. Aldur prófunarlífvera við upphaf váhrifa	Nýfrjóvguð hrogn (snemma á holfóstursstigi)	Nýfrjóvguð hrogn (snemma á holfóstursstigi)	Nýfrjóvguð hrogn
10. Fjöldi hrogna í hverri meðhöndlun	Lágmark 120	Lágmark 120	Lágmark 120
11. Fjöldi meðhöndlana	A.m.k. 3 (ásamt viðeigandi samanburði)	A.m.k. 3 (ásamt viðeigandi samanburði)	A.m.k. 3 (ásamt viðeigandi samanburði)
12. Fjöldi samhliða prófana í hverri meðhöndlun	A.m.k. 4 (nema skipting í samanburðarhópa sé samkvæmt kvaðratrótarúthlutun)	A.m.k. 4 (nema skipting í samanburðarhópa sé samkvæmt kvaðratrótarúthlutun)	A.m.k. 4 (nema skipting í samanburðarhópa sé samkvæmt kvaðratrótarúthlutun)
13. Fóðrunar-fyrirkomulag	Lifandi <i>Artemia</i> , frosnar fullvaxnar saltvatnsrækjur, fóður í flögum o.s.frv. Mælt er með að fæða tvisvar á dag	Sérstakt fóður fyrir ungfiska, lifandi <i>Artemia</i> , frosnar fullvaxnar saltvatnsrækjur, fóður í flögum o.s.frv. Mælt er með að fæða tvisvar á dag	Lifandi <i>Artemia</i> , frosnar fullvaxnar saltvatnsrækjur, fóður í flögum o.s.frv. Mælt er með að fæða tvisvar á dag

14. Loftun	Engin nema styrkur uppleysts súrefnis falli undir 60% af metnun	Engin nema styrkur uppleysts súrefnis falli undir 60% af metnun	Engin nema styrkur uppleysts súrefnis falli undir 70% af metnun
15. Þynningarvatn	Hreint yfirborðsvatn, brunnvatn eða endurgert vatn	Hreint yfirborðsvatn, brunnvatn eða endurgert vatn	Hreint yfirborðsvatn, brunnvatn eða endurgert vatn
16. Tímalengd váhrifa frá íðefni	60 dagar eftir klak	60 dagar eftir klak	60 dagar eftir klak
17. Líffræðilegir endapunktur	Árangur í klaki, lifun, formfræði, vitellógenín, vefjafræðileg rannsókn á kynkirtlum, erfðafræðilegt kyn, kynjahlutfall	Árangur í klaki, lifun, formfræði, vitellógenín, vefjafræðileg rannsókn á kynkirtlum, kynjahlutfall	Árangur í klaki, lifun, formfræði, vitellógenín, vefjafræðileg rannsókn á kynkirtlum, kynjahlutfall
18. Viðmiðanir fyrir ásættanleika prófunar fyrir safnsýni samhliða samanburðarprófana	Árangur í klaki > 80%	Árangur í klaki > 80%	Árangur í klaki > 80%
	Lifun eftir klak ≥ 70%	Lifun eftir klak ≥ 70%	Lifun eftir klak ≥ 70%
	Vöxtur (blautvigt fisks, þerraður) > 150 mg	Vöxtur (blautvigt fisks, þerraður) > 75 mg	Vöxtur (blautvigt fisks, þerraður) > 120 mg
	Lengd (staðallengd) > 20mm	Lengd (staðallengd) > 14 mm	Lengd (staðallengd) > 20 mm
	Kynjahlutfall (% hængar eða hrygnur) 30%–70%	Kynjahlutfall (% hængar eða hrygnur) 30%–70%	Kynjahlutfall (% hængar eða hrygnur) 30%–70%

3. viðbætur

Viðunandi efnaciginleikar þynningarvatns

INNIHALDSEFNI	STYRKUR
Efnisagnir	< 20 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	< 2 mg/l
Ójónað ammoníak	< 1 µg/l
Klórleifar	< 10 µg/l
Heildarstyrkur fosfórlífrænna varnarefna	< 50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjöklóruðum bifénylum	< 50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	< 25 ng/l

4. viðbætur

Úr prófunaraðferð C.14/leiðbeiningar um prófunarstyrk

Dálkur (fjöldi styrkleika milli 100 og 10 eða milli 10 og 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

(*) Velja má röð þriggja (eða fleiri) styrkleika úr hverjum dálki. Miðpunktur milli styrkleika í dálki (x) finnst í dálki (2x + 1). Tilgreind gildi geta staðið fyrir styrkleika sem eru gefnir sem hundraðshluti rúmmáls eða þyngdar (mg/l eða µg/l). Gildi má margfalda eða deila í þau með hvaða margfeldi sem er af 10 eftir því sem við á. Nota má dálk 1 ef veruleg óvissa ríkir um hve mikil eiturhrifin eru.

5. viðbætur

Leiðbeiningar um jafnblöndun á haus & sporði af ungvíði sebradanna, breiðkolls, hornsflís og japansks rískarpa

Tilgangurinn með þessum þætti er að lýsa verkferli sem á sér stað fyrir magnákvörðun á styrk vítellógeníns. Hægt er að nota annað verkferli sem leiðir til sambærilegrar magnákvörðunar á vítellógeníni. Það er valkvætt að ákvarða styrk vítellógeníns í blóðvökva eða lifur í staðinn fyrir jafning úr haus-/sporði.

Verkferli

1. Fiskurinn er svæfður og affífaður í samræmi við lýsingu á prófun.
2. Haus og sporður eru skorin af fiskinum í samræmi við lýsingu á prófun. **Mikilvægt:** Öll krufningaráhöld og skurðarbretti skal skola og hreinsa vandlega (t.d. með 96% etanóli) áður en hver fiskur er meðhöndlaður til að koma í veg fyrir „vítellógenínmengun“ frá hrygnum eða meðhöndluðum hængum yfir í ómeðhöndlaða hænga.
3. Samanlögð þyngd hauss og sporðs af hverjum fiski er mæld að næsta mg.
4. Eftir að hlutarnir hafa verið vegnir eru þeir settir í viðeigandi tilraunaglös (t.d. 1,5 ml eppendorf) og frystir við $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ þangað til þeir eru jafnaðir eða þeir eru strax jafnaðir á ís með tveimur plaststautum. (Hægt er að nota aðrar aðferðir ef þær eru gerðar á ís og útkoman er einsleitur massi). **Mikilvægt:** *Númera skal tilraunaglösin rétt þannig að hægt sé að tengja haus og sporð hvers fisks við bolhluta hans sem eru notaðir í vefjafræðirannsókn á kynkirtlum.*
5. Þegar einsleitur massi hefur náðst er bætt við iskaldri **jafnalausn fyrir jafning (*)** sem nemur fjór- til tífaldri þyngd vefjarins. Unnið er áfram með stautinn þar til blandan er jöfnuð. **Mikilvæg athugasemd:** *Nota skal nýjan staut fyrir hvern fisk.*
6. Sýnin eru geymd á ís fram að skiljun við $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ við 50000 g í 30 mínútur.
7. Notuð er pípetta til að setja 20–50 μl skammt af floti (magnið skal skráð) í *a.m.k. tvö* tilraunaglös með því að dýfa oddinum á pípettunni niður fyrir fitulagið á yfirborðinu og sjúga flotið varlega upp án fituarða eða kögglabrota.
8. Tilraunaglösin eru geymd við $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ uns þau eru notuð.

(*) Jafnalausn fyrir jafning

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% blanda prótínkljúfalata (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl blanda prótínkljúfalata (eða jafngildi blanda prótínkljúfalata).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Blanda prótínkljúfalata: Frá Sigma (fyrir spendýravefi), vara nr. **P 8340**.

Athugasemd: Nota skal jafnalausnina fyrir jafninginn sama dag og hún er tilreidd. Hún er höfð á ís meðan á notkun stendur.

6. viðbætur

Leiðbeiningar um magnákvörðun á vítellógeníni í haus-/sporðjafningi úr sebradanna (*Danio rerio*) (breytt frá Holbech o. fl., 2001). Hægt er að nota aðra verkferla með raðkvæmum mótefnum og stöðlum

1. Mikrótitrunarbakkar (vottaðir Maxisorp F96, Nunc, Hróarskeldu, Danmörku), sem áður eru húðaðir með 5 µg/ml af IgG-mótefni gegn sebradannalípóvíteílíni, eru þíddir upp og þvegnir þrisvar með þvottajafnalausn (*).
2. Hreinsuð staðallausn sebradannavítellógeníns (¹²) er raðþynnt í 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 og 20 ng/ml í þynningarjafnalausn (**). Sýnin eru þynnt a.m.k. 200 sinnum (til að koma í veg fyrir áhrif frá efniviði) í þynningarjafnalausn og sett á bakkana. Greiningarsamanburður er settur upp í tveimur eins sýnum. 150 µl eru settir í hverja holu. Staðlar eru settir upp í tveimur eins sýnum og sýni í þremur eins sýnum. Látið standa yfir nótt við 4 °C á hristara.
3. Bakkarnir eru þvegnir 5 sinnum með þvottajafnalausn.
4. HRP tengt við dextrínkeðju (t.d. AMDEX A/S, Danmörk) og tilsvandi mótefni eru þynnt í þvottajafnalausn; raunveruleg þynning er mismunandi eftir lotu og aldri. 150 µl eru settir í hverja holu og bakkarnir látnir standa í 1 klst. við stofuhita á hristara.
5. Bakkarnir eru þvegnir 5 sinnum með þvottajafnalausn (*) og botnar bakkanna eru hreinsaðir vandlega með etanóli.
6. 150 µl af TMB plus (***) eru settir í hverja holu. Bakkinn er varinn gegn birtu með álpappír og fylgst með lítaframköllun á hristara.
7. Þegar staðalferillinn er fullþróaður er ensímvirgni stöðvuð með því að bæta 150 µl 0,2 M H₂SO₄ í hverja holu.
8. Gleypnin er mæld við 450 nm (t.d. á Thermomax plötuljósmaeli frá Molecular Devices). Gögnin eru greind með tengdum hugbúnaði (t.d. Softmax).

(*) Þvottajafnalausn:

PBS-stofnlausn (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

pH-gildi er stillt að 7,3 og fyllt upp í 5 l með Millipore H₂O. Geymt við 4 °C.

(**) Þynningarjafnalausn:

PBS-stofnlausn (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

pH-gildi er stillt að 7,3 og fyllt upp í 1 l með Millipore H₂O. Geymt við 4 °C.

⁽¹²⁾ Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), hreinsað samkvæmt: 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 er undirstöðuefni, tilbúið til notkunar, framleitt af KemEnTec (Danmörk). Það er viðkvæmt fyrir birtu. Geymt við 4 °C.

(****) PBS-stofnlausn

NaCl	160,0	g
KH ₂ PO ₄	4,0	g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	26,6	g
KCl	4,0	g

pH-gildi er stillt að 6,8 og fyllt upp í 2 l með Millipore H₂O. Geymt við stofuhita.

7. viðbætur

Leiðbeiningar um undirbúning vefjasneiða til að ákvarða kyn og stigsákvarða kynkirtla

Tilgangurinn með þessum þætti er að lýsa verkferlunum sem á sér stað fyrir rannsókn á vefjasneiðum. Hægt er að nota önnur verkferli sem leiða til svipaðrar ákvörðunar á kyni og stigsákvörðunar á kynkirtlum.

Þetta verkferli er svipað að því er varðar japanskan rískarpa og sebradanna, með örfáum undantekningum.

Aflifun, krufning og festing á vef*Markmið:*

1. Að tryggja mannúðlega aflifun á fiskum.
2. Fá nauðsynlega skrokkþyngd og mælingar.
3. Meta annars stigs kyneinkenni.
4. Kryfja vefi m.t.t. greiningar á vítellógeníni.
5. Festa kynkirtla.

Verkferli:

1. Fiskur skal aflifaður rétt fyrir krufningu. Þess vegna skal ekki aflifa marga fiska í einu nema margir kryfjarar séu til staðar.
2. Fiskur er tekinn úr tilraunakerinu með litlum háf og fluttur í flutningsílátinu á krufningasvæðið.
3. Fiskurinn er settur í aflifunarlausn. Fiskurinn er tekinn úr lausninni þegar hann hættir að anda og bregst ekki við ytra áreiti.
4. Fiskurinn er vigtaður blautur.
5. Hægt er að setja fiskinn á korkplötu á borðið undir krufningarsmásjánni til að undirbúa vefi til greiningar á vítellógeníni.
 - a) Að því er varðar sebradanna er hausinn skorinn rétt aftan við eyruggann og sporðurinn skorinn rétt aftan við bakuggann.
 - b) Að því er varðar japanskan rískarpa er kviðurinn opnaður með því að skera varlega eftir miðlínunni kviðmegin frá brjóstgrindinni (e. *pectoral girdle*) að punkti rétt framan við raufina. Lifrinn er fjarlægð varlega með lítilli töng og litlum skærum.
6. Sýni til greiningar á vítellógeníni eru sett í eppendorf-tilraunaglós og fryst tafarlaust í fljótandi köfnunarefni.
7. Skrokkurinn, þ.m.t. kynkirtlarnir, er settur í formerkt vefjahylki úr plasti sem er sett í Davidsons- eða Bouins-festiefni. Magn festiefnisins skal vera a.m.k. tífalt meira en áætlað rúmmál vefjanna. Festiefnisílatíð er hrist varlega í fimm sekúndur til að losa loftbólur úr hylkinu.
8.
 - a) Allir vefir eru geymdir í Davidsons festiefni yfir nótt og síðan fluttir næsta dag í aðskilin ílát með 10% formalíni með hlutlausri jafnalausn. Ílát með hylkjum eru hrist varlega í 5 sekúndur til að tryggja að formalíníð komist almennilega inn í hylkin.
 - b) Vefirnir eru geymdir í Bouins-festiefni í 24 klst. og síðan fluttir í 70% etanól.

Vinnsla á vef*Markmið:*

1. Vefurinn er vatnssneyddur til að paraffínið komist nógu vel inn í hann.
2. Vefurinn er gegndreyptur með paraffíni til að viðhalda heilleika hans og skapa fastan flöt fyrir vefjasneiðingu.

Verkferli:

3. Merkt vefjahylki eru fjarlægð úr formalín-/etanólgeymslu og hylkin sett í vinnslukörfuna eða -körfurnar. Vinnslukarfan er sett í vefjavinnslubúnaðinn (e. *tissue processor*).
4. Vinnsluáætlunin er valin.
5. Eftir að vefjavinnslubúnaðurinn hefur lokið vinnsluferlinu má flytja körfuna eða körfurnar yfir í innsteypingarstöðina.

Innsteyping*Markmið:*

Sýnin eru staðsett rétt í paraffín í föstu formi til vefjasneiðingar.

Verkferli:

1. Karfan eða körfurnar með hylkjunum eru teknar úr vinnslunni og lagðar í framhólf hitunareiningar innsteypingarstöðvarinnar, sem er fyllt paraffíni, eða hylkin sett í aðskilinn paraffínhitara.
2. Fyrsta hylkið sem á að innsteypa er tekið úr framhólfi hitunareiningarinnar eða úr paraffínhitaranum. Lokið á hylkinu er fjarlægt og því fleygt og miðinn á hylkinu lesinn saman við dýraskrámar til að greiða úr hugsanlegu ósamræmi fyrir innsteypingu.
3. Valið er innsteypingarform af viðeigandi stærð.
4. Forminu er haldið undir krananum á skömmtunareiningunni og fyllt af bráðnu paraffíni.
5. Sýnið er tekið úr hylkinu og sett í bráðna paraffínið í forminu. Þetta er endurtekið með 4–8 sýnum í hvert paraffínform. Staðsetning hvers fisks fyrir sig er merkt með því að setja fisk nr. 1 í 180° horn við fiska 2–4/8.
6. Viðbótarparaffíni er bætt við til að hylja sýnið.
7. Formið með loklausa hylkinu er sett á kælingarplötu kælingareiningarinnar.
8. Eftir að paraffínið er komið í fast form er blokkinn (þ.e. harðnað paraffín sem inniheldur vefina og loklausa hylkið) tekin úr forminu.

Vefjasneiðing*Markmið:*

Vefjafræðilegar sneiðar eru skornar og settar upp til litunar.

Verkferli:

1. Fyrsti áfangi vefjasneiðingar „skipting“ (e. *facing*) fer fram sem hér segir:
 - a) Paraffínblokkinn er sett í greipina á örsniðlinum.
 - b) Greipin er færð fram með því að snúa hjólinu á örsniðlinum og þykkar sneiðar skornar af yfirborði paraffínblokkarinnar þangað til hnífurinn kemur að innsteypa vefnum.

- c) Þykkt sneiðanna í örsniðlinum er stillt á 3–5 mikron. Greipin er færð fram og margar sneiðar skornar af blokkinni til að fjarlægja allar skemmdir sem urðu til á skurðarflati vefjarins við grófskurðinn.
 - d) Hægt er að taka blokkina úr greipinni og leggja hana á hvolf á ís til að rennbleyta vefinn.
2. Næsta stig vefjasneiðingar er lokasneiðing og uppsetning vefjasneiða á sýnisgler. Þessi verkferli eru framkvæmd sem hér segir:
- a) Ef blokkinn var sett á ís er hún tekin af ísnum og sett aftur í greipina á örsniðlinum.
 - b) Þykkt sneiðanna í örsniðlinum er stillt á 3–5 mikron og greipin færð fram með því að snúa hjólinu á örsniðlinum. Skornar eru sneiðar af blokkinni þangað til skorin hefur verið „ræma“ sem inniheldur a.m.k. eina viðunandi sneið, þ.m.t. kynkirtla. (Hægt er, eins og nauðsynlegt er að gera við sneiðingu, að taka blokkina úr greipinni og leggja hana á hvolf á ís til að rennbleyta vefinn, setja hana síðan aftur í greipina).
 - c) Sneiðarnar eru láttnar fljóta flatar á yfirborði vatnsins í vatnsbaðinu. Reynt er að ná a.m.k. einni sneið sem er hrukkulaus og sem loftbólur hafa ekki safnast undir.
 - d) Smásjárýnisgler er sett á kaf undir bestu sneiðina sem er lyft upp úr vatninu með sýnisglerinu. Þetta ferli kallast uppsetning sneiðarinnar á sýnisglerið.
 - e) Fyrir sett af fiski eru undirbúnar þrjár sneiðar. Önnur og þriðja sneiðin eru teknar með millibili sem nemur 50 mikronum eftir fyrstu sneiðina. Ef fiskurinn og kynkirtlar hans eru ekki steypdir í sama sneiðarluta skal skera fleiri sneiðar til að tryggja að a.m.k. sex sneiðar, þ.m.t. kynkirtlar, fái úr hverjum fiski.
 - f) Númer blokkarinnar, sem sýnisglerið var útbúið úr, er skráð á sýnisglerið með glærupenna.
 - g) Sýnisglerið er sett í litunarstand.
 - h) Blokkinn er tekin úr greipinni og lögð á hvolf til geymslu.

Litun, notkun þekjuglerja og merking á sýnisglerjum

Markmið:

- Sneiðarnar eru litaðar til vefjameinafræðilegrar rannsóknar
- Sett er varanleg yfirborðsvörn á vefi sem hafa verið settir upp og litaðir.
- Litaðar sneiðar eru varanlega sanngreindar á þann hátt að þær séu að fullu rekjanlegar.

Verkferli:

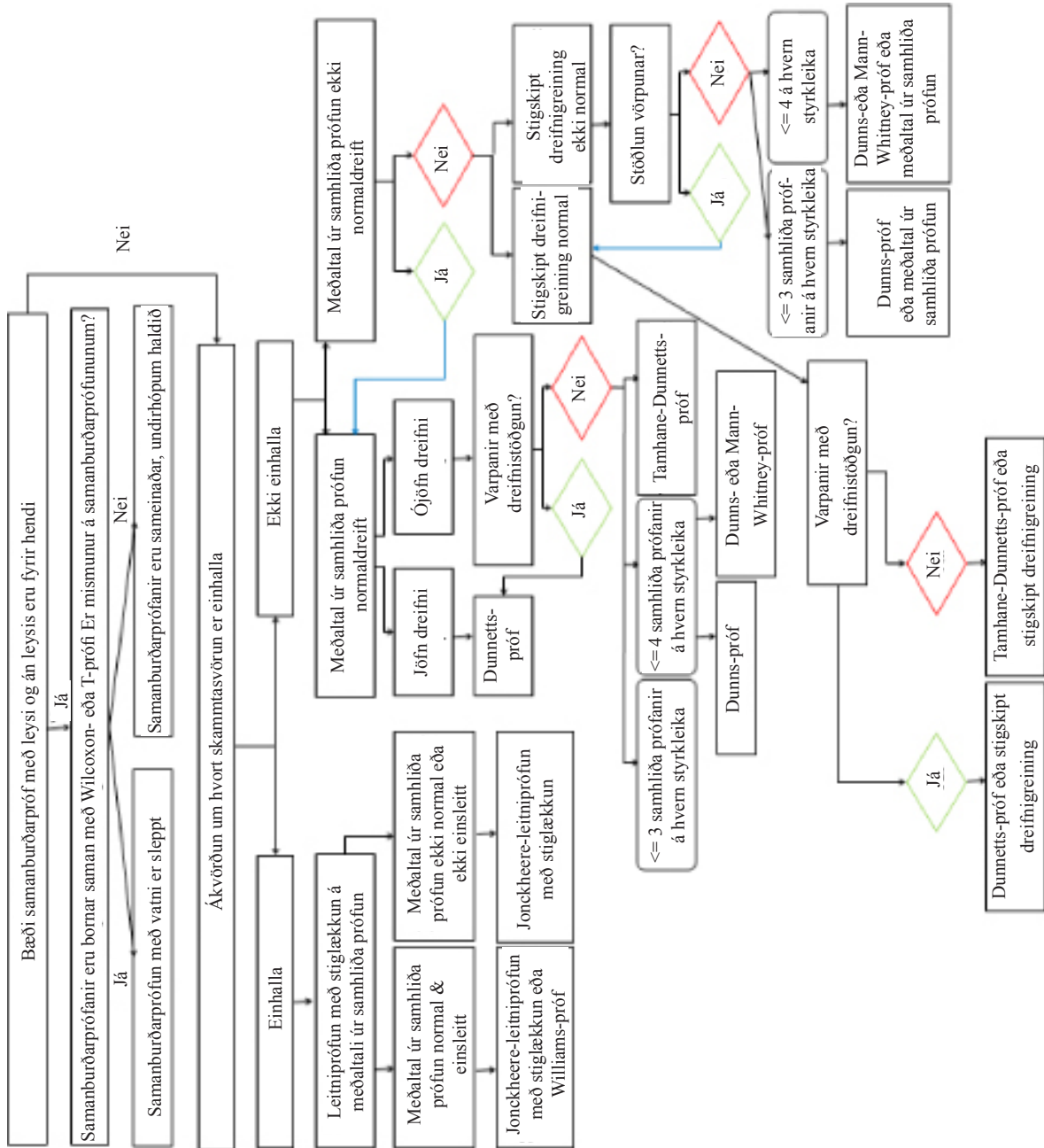
1. Litun
 - a) Sýnisgler eru loftþurrkuð yfir nótt fyrir litun.
 - b) Sneiðarnar eru litaðar með hematoxýlíneósíni.
2. Notkun á þekjugleri
 - a) Hægt er að nota þekjugler handvirkt eða sjálfvirkt.
 - b) Sýnisgleri er dýft í xýlen eða TissueClear og umframxýlen/-TissueClear er hrist varlega af því.
 - c) Um það bil 0,1 ml af uppsetningarmiðli (e. *mounting medium*) er sett nálægt endanum á sýnisglerinu á móti matta endanum eða á þekjuglerið.
 - d) Þekjuglerið er sett á sýnisglerið undir hvössu horni.

3. Merkingar

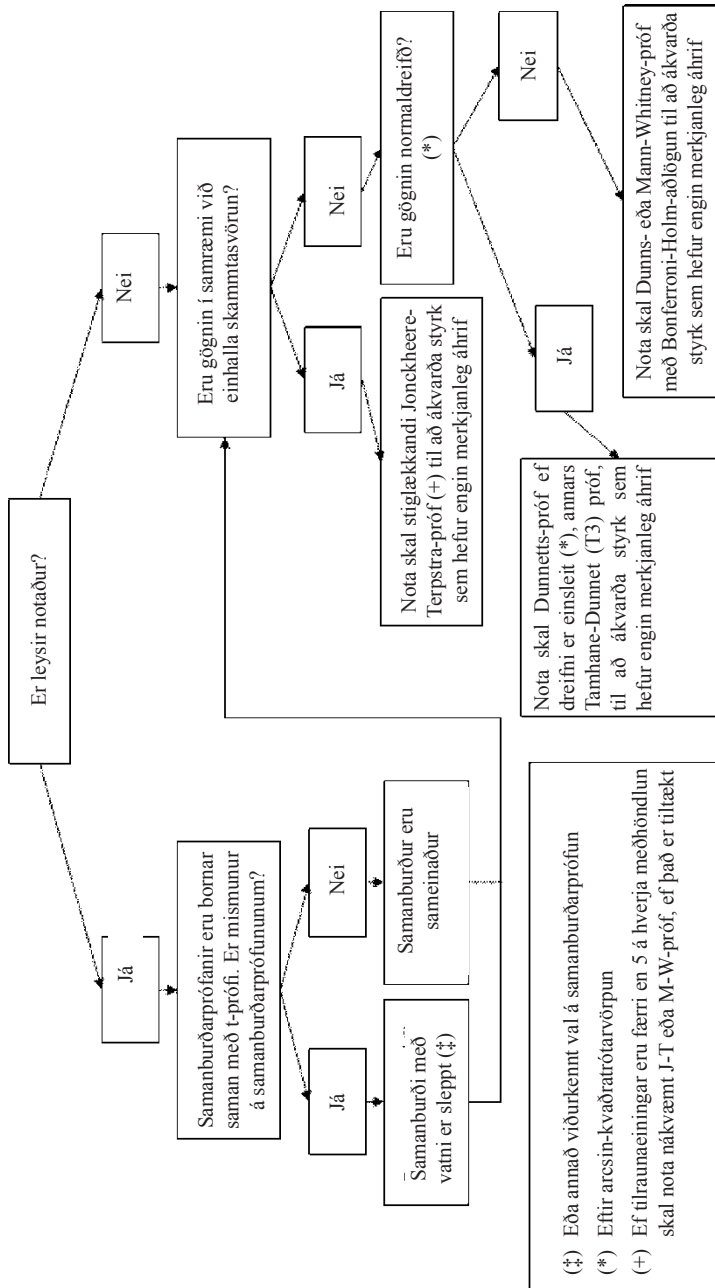
- a) Eftirtaldar upplýsingar skulu vera á hverjum sýnisglersmerkimiða:
 - i. Heiti rannsóknarstofu
 - ii. Tegund
 - iii. Númer sýnis/númer sýnisglers
 - iv. Íðefni/meðhöndlunarhópur
 - v. Dagsetning
-

8. viðbætur

Töfræðilegt flæðirit til greiningar á vítelögenini



Tölfræðilegt flæðirit til greiningar á kynjahlutfalli



*9. viðbætur***Leiðbeiningar um sýnatöku úr vef til að ákvarða erfðafræðilegt kyn og til að ákvarða erfðafræðilegt kyn með kjarnsýrumögnunaraðferð****Sýnataka úr vef, undirbúningur og geymsla fyrir ákvörðun á erfðafræðilegu kyni riskarpa með kjarnsýrumögnunaraðferð (útbúið af „Laboratory for Aquatic Organisms of Bayer CropScience AG“)**

1. Raufar- eða bakuggi er klipptur af hverjum fiski fyrir sig með fingerðum skærum og settur í tilraunaglas sem er fyllt með 100 µl af útdráttarjafnalausn 1 (sjá nánari upplýsingar um tilreiðslu jafnalausnar hér á eftir). Skærin eru hreinsuð eftir hvern fisk í bikarglasi sem er fyllt með eimuðu H₂O, og þerruð með pappírþurrku.
2. Nú er uggavefurinn jafnblandaður í örtilraunaglassi með teflonstaut til að sundra frumunum. Nýr stautur verður notaður í hvert tilraunaglas til að koma í veg fyrir hvers kyns mengun. Stautarnir verða settir í 0,5 M NaOH yfir nótt, skolaðir í eimuðu H₂O í 5 mínútur og geymdir í etanóli eða öðru, sóttthreinsuðu með gufusæfingu, uns þeir eru notaðir.
3. Einnig er mögulegt að geyma uggavefinn án útdráttarjafnalausnar 1 á þurrís og síðan í frystiskáp við – 80 °C til að koma í veg fyrir hvers kyns niðurbrot á DNA. Útdrátturinn gengur betur ef DNA er dregið út á sama tíma (sjá meðhöndlun hér á undan; sýnin skulu þídd upp á ís eftir geymslu við – 80 °C áður en jafnalausnin er sett í tilraunaglösin).
4. Eftir jafnblöndun eru öll tilraunaglösin sett í vatnsbað og soðin í 15 mínútur við 100 °C.
5. Síðan eru 100 µl af útdráttarjafnablöndu 2 (sjá nánari upplýsingar um tilreiðslu jafnalausnar hér á eftir) settar með pipettu í hvert tilraunaglas. Sýnin eru geymd við stofuhita í 15 mínútur og hrist varlega með handaflí af og til á þeim tíma.
6. Eftir það eru öll tilraunaglösin sett aftur í vatnsbað og soðin í aðrar 15 mínútur við 100 °C.
7. Tilraunaglösin eru fryst við – 20 °C fram að frekari greiningu.

Tilreiðsla jafnalausnar**Kjarnsýrumögnunarjafnalausn 1:**

500 mg N-láróýlsarkósín (t.d. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

þætt við 100 ml af eimuðu H₂O

→ gufusæft

Kjarnsýrumögnunarjafnalausn 2:

20 g Chelex (t.d. Biorad, Munich, GE)

Látið þenjast út í 100 ml af eimuðu H₂O

→ gufusæft

Ákvörðun á erfðafræðilegu kyni riskarpa (með kjarnsýrumögnunaraðferð) (útbúið af „Laboratory for Aquatic Organisms of Bayer CropScience AG“ og „Universität Würzburg Biozentrum“)

Tilbúna og frosnu tilraunaglösin (lýst í kaflanum fyrir ofan) eru þídd upp á ís. Eftir það eru þau skilin í Eppendorf-skilvindu (30 sek. á hámarkshraða við stofuhita). Tært flot, aðskilið frá botnfallinu, er notað í kjarnsýrumögnunina. Fordæst skal skilyrðislaust að einhverjar leifar af Chelex (í botnfallinu) flytjist yfir í kjarnsýrumögnunarefnahvarfið því það truflar virkni „Taq“-fjöllidarans. Flotið skal notað beint eða geymt frosið (við – 20 °C) og hægt er að þíða það upp aftur í nokkrum lotum til síðari greininga án neikvæðra áhrifa á DNA.

1. Tilreiðsla á „hvarfblöndu“ (e. Reaction Mix) (25 µl á hvert sýni):

	Magn	Endanlegur styrkur
DNA-mót	0,5µl–2µl	
10xPCR-jafnalausn með MgCl ₂	2,5µl	1x
Núkleótíð (hvert og eitt dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4µl (5mM)	200µM
Framvísir (e. <i>forward primer</i>) (10µM) (sjá 3–5 hér á eftir)	0,5µl	200nM
Bakvísir (e. <i>reverse primer</i>) (10µM) (sjá 3–5 hér á eftir)	0,5µl	200nM
Dímetylsúlfoxíð	1,25µl	5%
Vatn (af hreinleika sem er krafist í kjarnsýrumögnun)	allt að 25µl	
Taq-E-fjölliðari	0,3µl	1,5U

10xPCR-jafnalausn með MgCl₂: 670mM Tris/HCl (pH-gildi 8,8 við 25 °C), 160mM (NH₄)₂SO₄, 25mM MgCl₂, 0,1%Tween 20

Fyrir hverja kjarnsýrumögnun (sjá 3.–5. lið hér á eftir) þarf sérstaka vísinn (e. *special primer*) til að gera nýja samsetningu af „hvarfblöndunni“ og það magn sem þarf af móti fyrir DNA fyrir hvert sýni (sjá hér að ofan). Viðkomandi magn er flutt með pípettum í ný tilraunaglós. Eftir það er öllum tilraunaglösum lokað, hrært (ca 10 sek.) og skilin í skilvindu (10 sek. við stofuhita). Nú er hægt að hefja viðkomandi kjarnsýrumögnunaráætlun. Einnig skal nota jákvæðan samanburð (fyrirmyndar DNA-sýni með þekkta virkni og skýrar niðurstöður) og neikvæðan samanburð (1 µl af eimuðu H₂O) í hverri kjarnsýrumögnunaráætlun.

2. Tilreiðsla á agarósageli (1%) — meðan kjarnsýrumögnunaráætlanirnar eru keyrðar:

- 3 g af agarósa eru leyst upp í 300 ml 1 × TAE-jafnalausn (1% agarósagel)
- Þessi lausn skal soðin í örbylgjuofni (ca 2–3 mín.).
- Heit lausnin er flutt í sérstakt mót til storkunar (e. *casting box*) sem liggur á ís
- Eftir ca 20 mín. er agarósagelið tilbúið til notkunar
- Agarósagelið er geymt í 1 × TAE-jafnalausn þangað til kjarnsýrumögnunaráætlunum er lokið

3. Kjarnsýrumögnunaráætlun fyrir aktín:

Svörunin í þessari kjarnsýrumögnun miðar að því að sýna fram á að DNA í sýninu sé óskaddað.

- Sérstakur vísir:

„Mact1(upper/forward)“ → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(lower/reverse)“ → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

- Áætlun:

5 mín. 95 °C

Lota (35-sinnum);

Eðlissvipting → 45 sek. við 95 °C

Þáttatenging → 45 sek. við 56 °C

Lenging → 1 mín. við 68 °C

15 mín. 68 °C

4. Kjarnsýrumögnunaráætlun fyrir X- og Y-gen

Sýnin með ósködduðu DNA eru notuð í þessari kjarnsýrumögnunaráætlun til að greina X- og Y-gen. Karlkyns-DNA ætti að sýna eitt tvöfalt band og kvenkyns-DNA ætti að sýna eitt einfalt band (eftir litun og rafdrátt á geli). Í þessari keyrslu áætlunarinnar skal taka með einn jákvæðan samanburð fyrir karlkyn (XY-sýni) og einn fyrir kvenkyn (XX-sýni).

— Sérstakur vísir:

„PG 17,5“ (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17,6“ (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Áætlun:

5 mín. 95 °C

Lota (40-sinnum);

Eðlissvipting → 45 sek. við 95 °C

Þáttatenging → 45 sek. við 55 °C

Lenging → 1 mín. 30 sek. við 68 °C

15 mín. 68 °C

5. Kjarnsýrumögnunaráætlun fyrir Y-gen sem „samanburður“ fyrir kjarnsýrumögnunaráætlun fyrir X- og Y-gen:

Þessi kjarnsýrumögnunaráætlun sannprófar niðurstöður úr „kjarnsýrumögnunaráætluninni fyrir X- og Y-gen“. „Karlkyns-sýnin“ eiga að sýna eitt band og „kvenkyns-sýnin“ eiga ekki að sýna neitt band (eftir litun og rafdrátt á geli).

— Sérstakur vísir:

„DMTYa (upper/forward)“ → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (lower/reverse)“ → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Áætlun:

5 mín. 95 °C

Lota (40-sinnum);

Eðlissvipting → 45 sek. við 95 °C

Þáttatenging → 45 sek. við 56 °C

Lenging → 1 mín. við 68 °C

15 mín. 68 °C

6. Litun kjarnsýrumögnunarsýna:

Litunarlausn:

50% glýseról

100 mM etýlendíamintetraedíksýra

1% natríumdódekýlsúlfat

0,25% brómfenólblár

0,25% xýlensýanól

1 µl af litunarlausninni er sett með pípettu í hvert tilraunaglas

7. Upphaf rafdráttar með geli:

— Tilreidda 1% agarósagelið er flutt í gelrafdráttarhólf (e. *gel-electrophoresis-chamber*) sem er fyllt með 1 × TAE-jafnalausn

— 10–15 µl af hverju lituðu kjarnsýrumögnunarsýni eru settir með pípettu í agarósagelrauf

- 5–15 µl af 1kb-prótínstaðli (e. *Ladder*) (Invitrogen) eru settir í aðskilda rauf með pípettu
 - Rafdrátturinn er hafinn við 200 V
 - Stöðvað eftir 30–45 mín.
8. *Ákvörðun á böndum:*
- Agarósagelið er hreinsað í eimuðu H₂O
 - Síðan er agarósagelið flutt í etidíumbrómíð í 15–30 mín.
 - Eftir það skal taka mynd af agarósagelinu í kassa með útfjólubláu ljósi
 - Að lokum eru sýnin greind með samanburði við bandið (eða böndin) í jákvæða samanburðinum og prótínstaðalinn
-

10. viðbætur

Leiðbeiningar um sýnatöku úr vef til að ákvarða erfðafræðilegt kyn hornsíla með kjarnsýrumögnunaraðferð**Sýnataka úr vef og DNA-útdráttur**

Hægt er að draga út DNA með ýmiss konar hvarfmiðlum sem fást á almennum markaði og bæði handvirkum og sjálfvirkum útdráttarkerfum. Aðferðarlýsingin, sem notuð er á Cefas Weymouth-rannsóknarstofunni, er útlistuð hér á eftir og öðrum aðferðum hefur verið bætt við, eftir því sem við á.

1. Lítil bútur af vef (10–20 mg) er klipptur af bak- og hliðarsvæði hvers fisks fyrir sig með fingerðum skærum (eftir að haus og sporður hefur verið fjarlægður til greiningar á vítellógeníni). Vefurinn er settur í tilraunaglas sem er annað hvort sett beint í fljótandi köfnunarefni (til geymslu við – 80 °C) eða fyllt með 70% etanóli (til flutninga og síðan geymslu við 4 °C). Skærin eru hreinsuð í 70% etanóli eftir hvern fisk, síðan í eimuðu vatni og þerruð með pappírshurrku.
2. Etanólið (ef það er fyrir hendi) er fjarlægt með útsogi og vefurinn látinn brotna niður yfir nótt með próteasa K í 400 µl af ATL-jafnalausn (Qiagen). Deiliskammtur (200 µl) af niðurbrotslausninni er fluttur í S-blokk með 96 holum (Qiagen) og DNA dregið út á 96 holu sniði með „Qiagen Universal BioRobot“ og „Qlamp Investigator BioRobot kit“. DNA er skolað út í 50 µl af DNasa- og RNasa-lausu vatni. Ef harður vefur er notaður til að draga út DNA (t.d. hryggur eða eyruggi) getur verið nauðsynlegt að jafnblanda sýnið í sundrunarjafnalausn með því að nota FastPrep® vefjasundrara eða jafngilt vefjaniðurbrotskerfi.

Að öðrum kosti:

- a) Vefurinn er látinn brotna niður yfir nótt með próteasa K í 400 µl af G2 sundrunarjafnalausn (Qiagen) og DNA dregið út úr 200 µl af niðurbrotslausninni, annað hvort með því að nota „EZ-1 DNA easy tissue kit“ og „EZ-1 biorobot“ eða „DNA easy tissue mini kit“. DNA er skolað út í 50 µl rúmmáli.
 - b) Vefirnir eru unnir með því að nota DNazol-hvarfmiðil. Vefjasýni eru látin sundrast í 1ml af DNazol í 10 mínútur í 1,5 ml örskilvinduglasi og síðan skilin í skilvindu við 13000 rpm í 5 mínútur til að fjarlægja allar efnisagnir. Sundraða sýnið er síðan flutt í nýtt 1,5 ml örskilvinduglas sem inniheldur 500 µl af 100% etanóli af sameindalíffræðihreinleika og síðan skilið í skilvindu við 13000 rpm í 10 mínútur til að botnfella DNA. Etanólið er fjarlægt og þess í stað settir 400 µl af 70% etanóli af sameindalíffræðihreinleika, skilið í skilvindu við 13000 rpm í 5 mínútur og DNA-köggullinn er leystur upp í 50 µl af vatni sem er laust við DNasa- og RNasa-sameindir. Þegar harður vefur er notaður (eyruggi) getur verið nauðsynlegt að jafnblanda sýnið í sundrunarjafnalausn með því að nota FastPrep® vefjasundrara eða jafngilt vefjaniðurbrotskerfi áður en DNA er dregið út.
3. DNA er geymt við – 20 °C þangað til þörf er á því.

Mikilvæg athugasemd: nota skal hlífðarhanska meðan á verkferlinu stendur

Kjarnsýrumögnunargreining

Mögnun var framkvæmd með því að nota 2,5 µl af DNA-útdrættinum í 50 µl af hvarfblöndu með Idh genasætisvísun (e. *Idh locus primer*) (eins og lýst er af Peichel o.fl., 2004. *Current Biology* 1:1416-1424):

Framvísir 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'

Bakvísir 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Fjöldmargir birgjar útvega hentuga hvarfmiðla fyrir kjarnsýrumögnun. Aðferðin, sem er útlistuð hér á eftir, er sem stendur notuð á Cefas Weymouth-rannsóknarstofunni.

1. Tilreiðsla á „hvarfblöndu“ (e. *Reaction Mix*) (50 µl á hvert sýni):

Aðalblanda (e. *mastermix*) er tilreidd á eftirfarandi hátt: Hana er hægt að tilreiða fyrirfram og geyma í frysti við $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ þangað til þörf er á henni. Útbúa skal næga aðalblöndu í neikvæðan samanburð (einungis vatn af hreinleika sem krafist er í sameindalíffræðilegum rannsóknum).

	Rúmmál (styrkur stofnblöndu)/ sýnis	Endanlegur styrkur
5xGoTaq® hvarfjafnalausn (e. <i>reaction buffer</i>)	10µl	1x
MgCl ₂	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Núkleótíð (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM hvert)	250 µM hvert
Framvísir	0,5µl (0,1 nmól/µl)	2,0 µM
Bakvísir	0,5µl (0,1 nmól/µl)	2,0µM
Vatn af hreinleika sem krafist er í sameindalíffræðilegum rannsóknum	30,75 µl	
GoTaq-fjölliðari	0,25 µl	1,25U

- 47,5 µl eru settir í merkt 0,5 ml glas með þunnum hliðum sem er notað við kjarnsýrumögnun.
- 2,5 µl af hreinsuðu DNA er bætt í glasið sem er merkt á viðeigandi hátt. Endurtekið fyrir öll sýni og neikvæða samanburðinn.
- 2 dropar af jarðolíu eru settir ofan á. Að öðrum kosti skal nota lotuhitara með hituðu loki.
- Lokin eru sett á.
- Sýnin voru eðlissvipt í Peltier PTC-225 lotuhitara við $94 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ í 5 mínútur og því fylgdu 39 lotur við $94 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ í 1 mínútu, $55 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ í 1 mínútu, $72 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ í 1 mínútu og síðasta lenging við $72 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ í 10 mínútur.

2. Tilreiðsla á agarósageli (2%)

Venjan er að kjarnsýrumögnunarafurðir séu leystar upp á 20% agarósageli sem inniheldur etidíumbrómíð.

Einnig er hægt að nota rafdráttarkerfi með hárpípum.

- 2 g af agarósa eru vegin í 100 ml 1 × TAE-jafnalausn.
- Hitað í örbylgjuofni (ca 2–3 mín.) til að leysa agarósann upp.
- 2 dropum af etidíumbrómíði er bætt í, endanlegur styrkur 0,5 µg/ml.
- Heit lausnin er flutt í storknunarmótið (e. *gel casting equipment*).
- Gelið er látið storkna.

3. Rafdráttur á geli:

- Agarósagelið er sett í rafdráttarbúnaðinn og á kaf í 1 × TAE-jafnalausn.
- 20 µl af hverju sýni eru settir í aðskildar holur, mólþungastaðli (100 bp DNA-prótínstaðall, Promega) bætt í lausa holu.
- Rafdráttur er framkvæmdur við 120 V í 30–45 mínútur.

4. *Sjónræn greining á mögnunarafræðum*

Ef etídíumbrómíðið var sett í agarósagelið, eins og lýst er hér að framan, eru DNA-afurðirnar skoðaðar undir útfjólubláum ljósgjafa. Að öðrum kosti er agarósagelið litað með því að hylja gelið í þynningarlausn úr etídíumbrómíði (0,5 µg/ml í vatni) í 30 mínútur fyrir sjónrænu greininguna.

11. viðbætur

Leiðbeiningar um verklag við tæknifrjógung hornsíla

Tilgangurinn með þessum þætti er að lýsa verkferlunum til að ná frjógvudum hrognum úr hornsilum til að nota þau í prófun á kynþroska fiska

Verkferli

Sæði tekið úr hængum

1. Hængur í sterkum litum úr æskilegum stofni er aflífaður.
2. Svilin eru skorin úr hvorri hlið fisksins. Svilin eru alla jafna í mjög sterkum litum, staflaga og augljós við hliðlæga miðlínu skrokksins. Önnur hvor eftirfarandi aðferða er notuð:
3. Notuð eru fingerð skæri og hafist handa við gotrauf, klipptur 1–1,5 cm skurður í einni aðgerð undir u.þ.b. 45° horni.
4. Skurðarhnífur er notaður til að skera lítinn skurð í hlið fisksins, rétt aftan við grindarhol og kviðlægt við beinplötturnar (e. *lateral plates*).
5. Svilin eru fjarlægð með fingerðri tóng og sett í petrískál.
6. Hvor kynkirtill (svil) er þakinn með 100 µl af nýtilreiddri **endanlegri lausn Hanks** (*)
7. Svilin eru skorin í litla teninga með rakvélarblaði eða skurðarhníf. Við þetta losnar sæðið og lausn Hanks verður mjólkurlituð.
8. Vökvanum, sem inniheldur sæðið, er bætt í tilraunaglas en reynt að láta ekki bita af sviljavefnum fylgja með í pípettuna.
9. 800 µl af endanlegri lausn Hanks er bætt í tilraunaglasíð og blandað vel.
10. Ef þörf krefur er hægt að varðveita hænginn með því að festa hann í 100% etanóli eða öðru æskilegu festiefni. Þetta er einkum mikilvægt ef foreldrauppruni afkvæmanna er ákvarðaður í rannsókninni.

(*) Jöfnuð saltlausn Hanks (HBSS): Nota þarf jafnaða saltlausn Hanks til að varðveita sæðið meðan frjógungur er undirbúin.

Mikilvæg athugasemd: Þó að hægt sé að útbúa meirihluta nauðsynlegra stofnlausna fyrirfram skal tilreiða stofn 5 og síðan endanlegu lausnina á *notkunardegi*.

Stofn 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Eimað vatn	100 ml

Stofn 2

Na ₂ HPO ₄ (vatnsfrítt)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
Eimað vatn	100 ml

Stofn 3

CaCl ₂	0,72 g
Eimað vatn	50 ml

Stofn 4

MgSO₄·7H₂O 1,23 g

Eimað vatn 50 ml

Stofn 5 (nýtilreiddur)

NaHCO₃ 0,35 g

Eimað vatn 10 ml

Athugasemd: Ef eitthvað af söltunum, sem tilgreind eru að framan, eru til en með öðru vatnsinnihaldi (þ.e. 2H₂O en ekki vatnsfrí) er samt hægt að nota þau en fyrst skal stilla þyngdina á grundvelli sameindamassa.

Endanlega lausn Hanks skal sett saman í eftirfarandi röð:

Stofn 1 1,0 ml

Stofn 2 0,1 ml

Stofn 3 0,1 ml

Eimað vatn 8,6 ml

Stofn 4 0,1 ml

Stofn 5 0,1 ml

Blanda skal vel saman fyrir notkun.

Frjógvun

1. Stórar hrognafullar hrygnur eru greindar í æskilega stofninum; hrygnurnar eru ekki tilbúnar til hrognakreistingar fyrir en hægt er að sjá hrognin standa út úr gotraufinni. Tilbúnar hrygnur þekkjast á líkamsstöðunni „hausinn upp“.
2. Þumal fingri eða öðrum fingri er strokið varlega eftir hliðinni á fiskinum í áttina að sporðinum til að ýta undir losun hrognasekks í nýja petriskál. Endurtekið hinum megin og fiskurinn settur aftur í kerlið.
3. Hægt er að dreifa úr hrognunum (móta einfalt lag) með fingerðum pensli. Mikilvægt er að reyna að koma sem flestum hrognum í snertingu við sæðið og það hjálpar til að stækka yfirborðsflöt hrognanna. Mikilvæg athugasemd: Hrognunum er haldið rökum með því að vefja rakri pappírspurrku um þau (mikilvægt er að egginn séu ekki í beinni snertingu við vatn því það getur haft þau áhrif að æðabelgurinn harðni of snemma og hindri frjógvun). Fjöldi hroгна, sem hrygnur geta myndað, er mjög breytilegur en að meðaltali ætti að vera auðvelt að fá u.þ.b. 150 hrogn úr hverri hrognafullri hrygnu.
4. 25 µl af sæði í blöndu Hanks er dreift jafnt yfir allt yfirborð hrognanna með penslinum. Hrognin harðna fljótt og breyta um lit (innan mínútu) þegar frjógvun er hafin. Ef áætlaður fjöldi hroгна er yfir 150 skal endurtaka verkferlið. Á sama hátt gildir að ef hrognin harðna ekki innan mínútu skal bæta svolítið meira við af sæði. Mikilvæg athugasemd: Þó að meira sæði sé bætt við eykur það ekki endilega frjógvunarhlutfallið.
5. Hrognin og sæðislausnin skulu skilin eftir til að „vinna saman“ í a.m.k. 15 mínútur og setja skal frjógvuguðu hrognin í váhrifakerið innan 1,5 klst. frá frjógvun.
6. Verkferlið er endurtekið með því að nota aðra hrygnu þangað til æskilegum fjölda hroгна hefur verið safnað.
7. Nokkur hrogn úr síðustu lotunni eru geymd og fest í 10% ediksýru.

Talning hrogna og dreifing í prófunarkerin

1. Dreifa skal hrognunum jafnt milli allra meðhöndlunarstiga til að komast hjá erfðafræðilegri þjögun. Hverri lotu af frjóvguðum hrognum skal skipt upp í hópa af sömu stærð (jafnmarga og meðhöndlunarstigin) með bitlausu áhaldi (þ.e. tóng með breiðum kjafti (e. *entomology forceps*) eða með því að nota sáningarlykkju (e. *inoculation loop*). Ef stefnt er að 4 samhlíða prófunum á hverja meðhöndlun og 20 hrognum í hverri þarf að setja 80 hrogn í hvert váhrifaker. Mikilvæg athugasemd: Ráðlagt er að bæta 20% við aukalega (þ.e. 96 hrognum á hvert meðhöndlunarstig) þar til öruggt er talið að 100% frjóvgunarhlutfall náist.
2. Hornsilahrognum er mjög hætt við sveppasýkingum utan hreiðursins, sem hængurinn gætir. Meðhöndlun allra hrogna með metýlenbláma á fyrstu 5 dögum prófunarinnar er því afskaplega mikilvæg að því er þetta varðar. Stofnlausn af metýlenbláma er tilreidd með 1 mg/ml og bætt í váhrifakerið til að gefa hámarkslokastyrkinn 2,125 mg/l. Mikilvæg athugasemd: Ekki skal láta hornsili verða fyrir váhrifum frá metýlenbláma eftir að þau hafa klakist þannig að kerfið skal vera laust við metýlenbláma eigi síðar en á sjötta degi.
3. Hrognin eru skoðuð daglega og skrá skal dauð eða ófrjóvguð hrogn. Mikilvæg athugasemd: Hrognin ættu aldrei að vera utan vatns fyrr en þau klekjast, ekki einu sinni í mjög skamman tíma.

C.42 LÍFBRJÓTANLEIKI Í SJÓ

ALMENNUR INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 306 um prófanir (1992). Þegar upphaflegu prófunaraðferðirnar voru þróaðar var ekki vitað að hve miklu leyti niðurstöður úr skimunarprófunum á auðlífrjótanleika með ferskvatni og skólþfrárennsli eða virkri seyru, sem notuð er sem sáð, gætu nýst fyrir sjávarumhverfið. Tilkynt hefur verið um breytilegar niðurstöður varðandi þetta atriði (t.d. 1. heimild)).
2. Mikið af iðnaðarskólpi, sem inniheldur ýmis iðefni, kemst út í sjó, annað hvort með beinni losun eða um árósa og ár þar sem viðstöðutíminn er stuttur samanborið við þann tíma sem er nauðsynlegur til að algert lífniðurbrot geti orðið á mörgum þeim iðefnum sem eru til staðar. Þar eð vaxandi skilningur er á nauðsyn þess að vernda sjávarumhverfið gegn síauknu magni iðefna og á nauðsyn þess að áætla líklegan styrk iðefna sem eru í sjónum hafa verið þróaðar prófunaraðferðir fyrir lífrjótanleika í sjó.
3. Í þeim aðferðum sem hér er lýst er notaður náttúrulegur sjór, bæði sem vatnsfasi og sem uppspretta örvera. Í viðleitni til samræmingar við aðferðir fyrir auðlífrjótanleika í ferskvatni var rannsökuð notkun á ofursíuðum sjó og sjó sem hefur verið settur í skilvindu ásamt notkun á sjávarseti sem sáði. Þessar rannsóknir báru ekki árangur. Prófunarmiðillinn er því náttúrulegur sjór sem hefur verið formeðhöndlaður til að fjarlægja grófar agnir.
4. Til að meta fullnaðarlífbrjótanleika með hristiflöskuaðferðinni þarf að nota hlutfallslega háa styrkleika af prófunarefninu vegna þess að greiningaraðferð með uppleystu, lífrænu kolefni hefur lítið næmi. Þetta kallar líka á viðbót steinefna (N og P) í sjóinn þar eð lítill styrkleiki þeirra myndi annars takmarka fjarlægingu á uppleysta, lífræna kolefninu. Einnig er nauðsynlegt að bæta næringarefninum við í aðferð með lokaðri flösku (e. *Closed Bottle Method*) vegna styrks prófunarefnisins sem er bætt við.
5. Þar af leiðandi eru aðferðirnar ekki prófanir á auðlífrjótanleika þar eð engu sáði er bætt við til viðbótar við örverurnar sem eru þegar til staðar í sjónum. Í prófunum er heldur ekki líkt eftir sjávarumhverfinu þar eð næringarefnum er bætt við og styrkur prófunarefnisins er mun hærri en yrði fyrir hendi í sjónum. Af þessum sökum eru aðferðirnar settar hér fram undir nýjum undirþætti, „Lífbrjótanleiki í sjó“.

NOTKUN

6. Niðurstöður úr prófununum, sem yrðu notaðar þar eð notkunarmynstur og förgun viðkomandi efnis bentu til leiðar að sjónum, veita fyrstu visbendingar um lífrjótanleika í sjó. Ef niðurstaðan er jákvæð (> 70% fjarlæging á uppleystu, lífrænu kolefni; 60% fræðileg súrefnisþörf) má draga þá ályktun að lífniðurbrot í sjávarumhverfinu geti átt sér stað. Neikvæð niðurstaða útilokar þó ekki slíkan möguleika en gefur til kynna að þörf sé á frekari rannsókn, t.d. með því að nota eins lágan styrkleika prófunarefnis og hægt er.
7. Ef krafist er endanlegra gildis fyrir hraða eða umfang lífniðurbrots í sjó á tilteknum stað yrði hvort heldur sem er að nota aðrar flóknari og þróaðri og þar af leiðandi dýrari aðferðir. Til dæmis væri hægt að nota hermiprófun með styrk prófunarefnis sem er nær líklegum styrk í umhverfinu. Einnig væri hægt að nota sjó frá svæðinu, sem er til athugunar, sem hefur ekki verið styrktur eða formeðhöndlaður og hægt væri að fylgja frumlífniðurbroti eftir með sértækri efnagreiningu. Að því er varðar fullnaðarlífbrjótanleika yrðu ¹⁴C-merkt efni nauðsynleg til að hægt væri að mæla brotthvarfshraða uppleysanlegs lífræns ¹⁴C og framleiðslu á ¹⁴CO₂ við umhverfislega raunhæfan styrk.

VAL Á AÐFERÐUM

8. Val á því hvaða aðferð skal nota veltur á nokkrum þáttum; eftirfarandi tafla er sett fram til að aðstoða við valið. Þó að ekki sé hægt að prófa efni með vatnsleysni undir jafngildi u.þ.b. 5 mg C/l með hristiflöskuaðferðinni er að jafnaði a.m.k. hægt að prófa torleysanleg efni með aðferðinni með lokaðri flösku.

Táfla

Kostir og gallar hristiflöskuprófunar og prófunar í lokaðri flösku

ADFERÐ	KOSTIR	GALLAR
HRISTIFLASKA	<ul style="list-style-type: none"> — einfaldur búnaður að undanskildu kolefnagreiningartæki — tímalengdin 60 dagar er ekki vandamál — engin truflun vegna nítunar — hægt að laga að rokgjörnum efnum 	<ul style="list-style-type: none"> — þarf kolefnagreiningartæki — notar 5–40 mg af uppleystu, lífrænu kolefni/l, gæti verið hamlandi — ákvörðun á uppleystu, lífrænu kolefni er erfið við lágan styrk í sjó (áhrif klóríðs) — gildi uppleysts, lífræns kolefnis er stundum hátt í sjó
LOKUD FLASKA	<ul style="list-style-type: none"> — einfaldur búnaður — einföld lokaákvörðun — notar lágan styrk prófunarefnis (2 mg/l) og því minni líkur á hömlun — hægt að laga auðveldlega að rokgjörnum efnum 	<ul style="list-style-type: none"> — gæti verið erfið að viðhalda loftþéttni í flöskum — bakteríuvöxtur á innra borði getur leitt til rangra gilda — súrefnisupptökugildi í blanksýnum geta verið há, einkum eftir 28 daga; hægt að vinna bug á því með öldrun sjávar — hugsanlegar truflanir á súrefnisupptöku vegna nítunar

HRISTIFLÖSKUADFERÐ

INNGANGUR

- Þessi aðferð er afbrigði fyrir sjó af breyttu OECD-skimunarprófuninni sem lýst er í kafla C.4B í þessum viðauka (2. heimild). Lokið var við hana í kjölfar niðurstöðu úr hringprófun sem danska Vatnsgæðastofnunin (da. *Vandkvalitetsinstituttet*) (3. heimild) skipulagði fyrir framkvæmdastjórn Evrópusambandsins.
- Líkt og í meðfylgjandi aðferð með lokaðri flösku í sjávarumhverfi skal ekki taka niðurstöðurnar úr þessari prófun sem vísbendingu um auðlífrjótanleika heldur skal nota þær sérstaklega til að afla upplýsinga um lífrjótanleika efna í sjávarumhverfinu.

MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

- Fyrirframákvarðað magn prófunarefnis er leyst upp í prófunarmiðlinum til að gefa styrk sem nemur 5–40 mg af uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)/l. Ef takmarkanir á næmi greiningar á lífrænu kolefni eru bættar getur verið hagstætt að nota minni styrk prófunarefnisins, einkum að því er varðar lata. Lausnin með prófunarefninu í prófunarmiðlinum er ræktuð við hristing í myrkri eða í dreifðu ljósi við loftháðar aðstæður við stöðugt hitastig (með nákvæmni ± 2 °C) sem er yfirleitt á bilinu 15–20 °C. Í tilvikum þar sem markmið rannsóknarinnar er að líkja eftir umhverfisaðstæðum er hægt að framkvæma prófanir við annað hitastig en þetta venjulega hitastigsbil. Mælt er með því að hámarks lengd prófunarinnar sé u.þ.b. 60 dagar. Niðurbrotinu er fylgt eftir með mælingum á uppleystu, lífrænu kolefni (endanlegt niðurbrot) og í sumum tilvikum sértækri greiningu (frumniðurbrot).

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

- Til þess að vita hvort nota megi prófunina á tiltekin efni verða sumir eiginleikar þess vera þekktir. Innihald lífræns kolefnis í efninu verður að vera þekkt, rokgirmi þess verður að vera þannig að verulegt tap eigi sér ekki stað meðan á prófuninni stendur og vatnsleysni þess skal vera meiri en jafngildi 25–40 mg C/l. Að auki skal prófunarefnið ekki ásogast verulega á gleryfirborð. Upplýsingar um hreinleika eða innbyrðis hlutföll aðalefnisþátta prófunarefnisins eru nauðsynlegar til að hægt sé að túlka niðurstöðurnar, sérstaklega þegar niðurstöðurnar eru nærri því að standast viðmiðunarmörk.

5. Upplýsingar um eiturrif prófunarefnisins á bakteríur, t.d. eins og mælt er í stuttum prófunum á öndun (4. heimild), geta verið gagnlegar til að velja viðeigandi prófunarstyrkleika og geta skipt sköpum fyrir rétta túlkun á lágum gildum fyrir lífniðurbrot. Slíkar upplýsingar eru þó ekki alltaf fullnægjandi til að túlka niðurstöður sem fást úr prófunum á lífniðurbroti og aðferðin, sem lýst er í 18. lið, á betur við.

VIÐMIÐUNAREFNI

6. Nota skal hentug viðmiðunarefni til að fylgjast með virkni örvera í sjávarsýninu. Natriumbensóat, natriumasetat og anilín eru dæmi um efni sem má nota í þessum tilgangi. Viðmiðunarefnið verður að brotna niður á tiltölulega stuttum tíma, annars er mælt með að prófunin sé endurtekin með öðru sjávarsýni.
7. Í hringprófun framkvæmdastjórnar Evrópusambandsins þar sem sjávarsýni voru tekin á mismunandi stöðum og á mismunandi árstíma (3. heimild) var upphafsfasinn (t_L) og tíminn til að ná 50% niðurbroti (t_{50}), að undanskildum upphafsfasanum, annars vegar 1–4 dagar og hins vegar 1–7 dagar fyrir natriumbensóat. Að því er varðar anilín var t_L á bilinu 0–10 dagar en t_{50} á bilinu 1–10 dagar.

SAMANBURÐARNÁKVÆMNI OG NÆMI AÐFERÐARINNAR

8. Samanburðarnákvæmni aðferðarinnar var fastsett í hringprófuninni (3. heimild). Minnsti styrkur prófunarefnis, þar sem hægt er að nota þessa aðferð með greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni, ákvarðast að miklu leyti af greiningarmörkunum í greiningu á lífrænu kolefni (u.þ.b. 0,5 mg C/l, eins og er) og styrk uppleysta, lífræna kolefnisins í sjónum sem er notaður (yfirleitt af stærðargráðunni 3–5 mg/l í sýnum úr rúmsjó). Bakgrunnsstyrkur uppleysta, lífræna kolefnisins ætti ekki að vera hærri en u.þ.b. 20% af heildarstyrk uppleysta, lífræna kolefnisins eftir að prófunarefninu er bætt við. Ef þetta er ekki gerlegt er stundum hægt að minnka bakgrunnsstyrk uppleysta, lífræna kolefnisins með öldrun sjávar fyrir prófun. Ef aðferðin er eingöngu notuð með sértækri efnagreiningu (sem mælir frumniðurbrot) skal rannsakandinn tilgreina á grundvelli viðbótarupplýsinga hvort búast megi við endanlegu niðurbroti. Þessar viðbótarupplýsingar geta samanstaðið af niðurstöðum úr öðrum prófunum á auðlífrjótanleika eða eðlislægum lífrjótanleika.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

9. Venjulegur rannsóknarstofubúnaður og:
 - a. hristari sem tekur 0,5–2 lítra keiluflokskur, annað hvort með sjálfvirkri hitastýringu eða sem er notaður í herbergi með stöðugu hitastigi við 15–20 °C með nákvæmni ± 2 °C,
 - b. keiluflokskur með þröngum hálsi, 0,5–2 lítra,
 - c. himnusíunarbúnaður eða skilvinda,
 - d. himnusíur, 0,2–0,45 μm ,
 - e. kolefnisgreiningartæki,
 - f. búnaður fyrir sértæka greiningu (valkvætt).

Sjór

10. Tekið er sjávarsýni í ílát sem hefur verið hreinsað vandlega og flutt á rannsóknarstofuna, helst innan sólarhrings eða tveggja daga frá söfnuninni. Á meðan á flutningi stendur skal ekki leyfa hitastigi sýnisins að fara umtalsvert yfir það hitastig sem verður notað í prófuninni. Tilgreina skal sýnatökustaðinn nákvæmlega og lýsa honum m.t.t. mengunar- og næringarefnaástands. Einkum að því er varðar strandsjó skal þessi lýsing á eiginleikum innihalda fjölda örveruþyrpinga ófrumbjarga lífvera og ákvörðun á styrk uppleysts nítrats, ammóníums og fosfats.

11. Veita skal eftirfarandi upplýsingar um sjálft sjávarsýnið:
- dagsetning söfnunar,
 - dýpið sem sýnið er tekið á,
 - útlit sýnis — gruggugt o.s.frv.,
 - hitastig þegar sýnið er tekið,
 - selta,
 - uppleyst, lífrænt kolefni (DOC),
 - tíminn milli þess að sýni er tekið þar til það er notað í prófuninni.
12. Ef innihald uppleysts, lífræns kolefnis í sjávarsýninu er mikið (8. liður) er mælt með því að sjórin verði látinn standa í u.þ.b. viku áður en hann er notaður. Sýnið er geymt við loftháðar aðstæður, við prófunarhitastigið og í myrkri eða dreifðu ljósi. Ef nauðsyn krefur skal viðhalda loftháðum aðstæðum með því að lofta varlega. Við öldrun dregur úr innihaldi auðbrjótanlegra lífrænna efna. Í hringprófuninni (3. heimild) kom ekki í ljós neinn munur á niðurbrotsmöguleikum sjávarsýna eftir öldrun og nýttekinna sjávarsýna. Fyrir notkun skal formeðhöndla sjóinn til að fjarlægja grófar agnir, t.d. með síun gegnum nælonsíu eða grófa pappírssi (ekki himnur eða GF-C-síur) eða með botnfellingu og umhellingu. Greina verður frá aðferðinni sem er notuð. Framkvæma skal formeðhöndlun eftir öldrun, ef hún er notuð.

Stofnlausnir fyrir steinefni

13. Eftirfarandi stofnlausnir eru tilreiddar með prófefni af greiningarhreinleika:

a)	Kalíumtvívvetnisortófosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Díkalíumhýdrógenortófosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Tvínatríumvetnisortófosfatdihýdrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
	Ammóníumklóríð, (NH_4Cl)	0,50 g
	Leyst upp í eimuðu vatni og fyllt að 1 lítra	
b)	Kalsíumklóríð, CaCl_2	27,50 g
	Leyst upp í eimuðu vatni og fyllt að 1 lítra	
c)	Magnésíumsúlfatheptahýdrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
	Leyst upp í eimuðu vatni og fyllt að 1 lítra	
d)	Járn(III)klóríðhexahýdrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	Leyst upp í eimuðu vatni og fyllt að 1 lítra	

Hægt er að koma í veg fyrir útfellingu í lausn d) með því að bæta einum dropa af óblandaðri saltsýru eða 0,4 g af etýlendíamíntetraedíksýru (EDTA, dínatríumsalt) í hvern lítra. Ef botnfall myndast í stofnlausn skal skipta henni út fyrir nýtilreidda lausn.

Tilreiðsla á prófunarmiðli

14. Bæta skal 1 ml af hverri stofnlausn hér fyrir ofan í hvern lítra af formeðhöndluðum sjó.

Sáð

15. Ekki skal bæta við sérstöku sáði til viðbótar við örverurnar sem þegar eru til staðar í sjónum. Þyrpingarfjöldi ófrumbjarga lífvera í sjávarprófunarmiðlinum er ákvarðaður (valkvætt) (og helst einnig í upprunalegu sjávarsýnunum) t.d. með líftölu þar sem notaður er sjávaragar (e. *marine agar*). Þetta er einkum æskilegt varðandi sýni frá strandsvæðum eða menguðum stöðum. Fylgst er með virkni ófrumbjarga lífvera í sjónum með því að framkvæma prófun með viðmiðunarefni.

Undirbúningur á flöskum

16. Tryggja skal að öll glerilát séu nákvæmlega hreinsuð, þó ekki endilega sótthreinsuð, (t.d. með alkóhólsaltsýru), skoluð og þurrkuð fyrir notkun til að koma í veg fyrir mengun vegna leifa frá fyrri prófunum. Einnig skal hreinsa flöskurnar fyrir fyrstu notkun.
17. Prófunarefnið er metið í tveimur eins flöskum samtímis ásamt einni flösku fyrir viðmiðunarefnið. Framkvæmd er blankprófun tvisvar, hvorki með prófunarefni né viðmiðunarefni, til að ákvarða greiningarleg blanksýni. Prófunarefnin eru leyst upp í prófunarmiðlinum — hægt er að bæta þeim við með hagkvæmum hætti með sterkri stofnlausn — til að fá æskilegan upphafsstyrk, yfirleitt 5–40 mg af uppleystu, lífrænu kolefni/l. Viðmiðunarefnið er yfirleitt prófað við upphafsstyrk sem samsvarar 20 mg af uppleystu, lífrænu kolefni/l. Ef notaðar eru stofnlausnir prófunarefna og/eða viðmiðunarefna skal tryggja að seltu sjávarmiðilsins sé ekki breytt mikið.
18. Ef búast má við eiturrifum eða ekki hægt að útiloka þau getur verið ráðlegt að fella einnig tvöfalda hömlunartilraun undir tilhögun prófunarinnar. Setja skal prófunarefnin og viðmiðunarefnin í sama ílát þar eð styrkur viðmiðunarefnisins er yfirleitt sá sami og í samanburðarprófuninni (þ.e. 20 mg af uppleystu, lífrænu kolefni/l) til að hægt sé að gera samanburð.
19. Hæfilegu magni af prófunarlausninni er skammtað í keiluflöskurnar (allt að helmingur af rúmmáli flöskunnar er hentugt magn) og síðan skal loka hverri flösku með lausu loki (t.d. álpappír) sem gerir loftskipti milli flöskunnar og loftsins umhverfis hana möguleg. (Ekki er heppilegt að nota baðmullartappa ef greining á uppleystu, lífrænu kolefni er notuð). Ílátin eru sett í hristarann og hrist stöðugt á litlum hraða (t.d. 100 snún./mín.) meðan á prófuninni stendur. Hitastiginu er stýrt (15–20 °C með nákvæmni ± 2 °C) og ílátunum hlíft við ljósi til að koma í veg fyrir þörungavöxt. Tryggja skal að loftið sé laust við eiturefni.

Eðlisefnafræðileg samanburðarprófun (valkvætt)

20. Ef grunur er um niðurbrot án tilstillis lífvera eða eyðingarferli s.s. vatnsrof (eingöngu vandamál með sértækri greiningu), uppgufun eða ásóð er ráðlegt að framkvæma eðlisefnafræðilega samanburðartilraun. Þetta er hægt að gera með því að bæta kvikasilfurs(II)klóríði (HgCl_2)⁽¹³⁾ (50–100 mg/l) í ílátin með prófunarefninu til að stöðva virkni örvera. Marktæk minnkun á styrk uppleysts, lífræns kolefnis eða tiltekins efnis í eðlisefnafræðilegu samanburðarprófuninni gefur vísbendingar um ólífræn fjarlægingarferli. (Ef kvikasilfursklóríð er notað skal gefa gaum að truflunum eða hvataeitrunum í greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni.)

Fjöldi flaskna

21. Í dæmigerðri prófun eru eftirfarandi flöskur notaðar:

- | | |
|-----------------|--|
| 1. og 2. flaska | — inniheldur prófunarefni (prófunarsviflausn) |
| 3. og 4. flaska | — inniheldur eingöngu sjó (blanksýni) |
| 5. flaska | — inniheldur viðmiðunarefni (aðferðarsamanburður) |
| 6. flaska | — inniheldur prófunar- og viðmiðunarefni (eiturrifasamanburður) — valkvætt |
| 7. flaska | — inniheldur prófunarefni og dauðhreinsandi efni (dauðhreinsaður samanburður án lífvera) — valkvætt. |

Greining á uppleystu, lífrænu kolefni

22. Meðan á prófuninni stendur skal taka sýni með hæfilegu millibili fyrir greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (1. viðbætur). Alltaf skal taka sýni í upphafi prófunarinnar (dagur 0) og á 60. degi. Þörf er á a.m.k. fimm sýnum samtals til að lýsa tímarás niðurbrotsins. Ekki er hægt að tiltaka ákveða tímaáætlun fyrir sýnatöku þar eð hraði lífniðurbrots er mismunandi. Ákvörðun á uppleystu, lífrænu kolefni er gerð tvisvar fyrir hvert sýni.

⁽¹³⁾ Kvikasilfurs(II)klóríð (HgCl_2) er mjög eitruð efni sem skal meðhöndla samkvæmt viðeigandi varúðarráðstöfunum. Farga skal vatnskendum úrgangi sem inniheldur þetta íðefni á viðeigandi hátt; ekki skal losa hann í skólperfið.

Sýnataka

23. Tilskilið magn sýnanna veltur á greiningaraðferðinni (sértæk greining), á kolefnisgreiningartækinu sem notað er og á aðferðinni (himnusiun eða skiljun í skilvindu) sem valin er til meðhöndlunar á sýninu áður en kolefnið er ákvarðað (25. og 26. liður). Fyrir sýnatöku skal tryggja að prófunarmiðlinum sé blandað vandlega saman og að allt efni sem loðir við innra borð flöskunnar leysist upp eða dreifist.
24. Síað er með himnusiú eða skilið í skilvindu strax eftir sýnatöku. Síuð eða skilin sýni eru geymd, ef þörf krefur, við 2–4 °C í allt að 48 klst. eða við undir –18 °C í lengri tíma (ef vitað er að efnið helst óbreytt er sýrt að pH-gildinu 2 fyrir geymslu).
25. Himnusiur (0,2–0,45 µm) henta ef tryggt er að þær gefi hvorki frá sér kolefni né ásogi efnið á síunarþrepinu, t.d. himnusiur úr pólýkarbónati. Sumar himnusiur eru gegndreyptar með yfirborðsvirkum efnum til að gera þær vatnssæknar og geta losað talsvert magn af uppleystu kolefni. Slíkar síur eru undirbúnar með því að sjóða þær í afjónuðu vatni í þrjú samfelld tímabil, hvert þeirra er ein klukkustund. Eftir suðu skal geyma síurnar í afjónuðu vatni. Fyrstu 20 ml af síuvökvanum er hent.
26. Hægt er að velja að skilja sýnin í skilvindu í stað himnusiunar. Skiljun við 40000 m·s⁻² (~4000 g) í 15 mínútur, helst í kælskilvindu.

Athugasemd: Aðgreining á heildarmagni lífræns kolefnis (TOC) frá uppleystu, lífrænu kolefni (TOC/DOC) með skiljun við mjög lágan styrk virðist ekki virka þar eð annað hvort eru ekki allar bakteríurnar fjarlægðar eða kolefni, sem hluti af bakteríuplasmíði, er enduruppleyst. Við hærri prófunarstyrk (> 10 mg C á hvern lítra) virðist skekkja skiljunarinnar vera tiltölulega lítil.

Tíðni sýnatöku

27. Ef greiningar eru gerðar strax eftir sýnatöku skal meta næsta sýnatökutíma með hliðsjón af niðurstöðunum úr magngreiningunni.
28. Ef sýni eru varðveitt (24. liður) til greiningar síðar meir skal taka fleiri sýni en lágmarksfjöldann fimm sýni. Síðustu sýnin eru greind fyrst og með þrep skiptu „afturábak“ vali á viðeigandi sýnum til greiningar er hægt að fá góða lýsingu á ferlinum fyrir lífniðurbrot með tiltölulega fáum magngreiningum. Ef ekkert niðurbrot hefur átt sér stað í lok prófunarinnar er ekki þörf á að greina fleiri sýni og við slíkar aðstæður getur „afturábak“ aðferðin sparað töluverðan kostnað við greiningu.
29. Komi fram jafnvægi á ferli niðurbrots fyrir 60. dag skal ljúka prófuninni. Ef niðurbrot hefur greinilega hafist fyrir 60. dag en ekki náð jafnvægi skal framlengja tilraunina um eitt tímabil.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

30. Greiningarniðurstöðurnar eru skráðar á meðfylgjandi gagnablað (2. viðbætur) og reiknuð út gildi fyrir lífniðurbrot fyrir bæði prófunarefni og viðmiðunarefni samkvæmt jöfnunni:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

þar sem:

- D_t = niðurbrot uppleysts, lífræns kolefnis í hundraðshlutum eða fjarlægging tiltekens efnis á tíma t ,
 C_0 = upphafsstyrkur uppleysta, lífræna kolefnisins eða tiltekens efnis í prófunarmiðlinum,
 C_t = styrkur uppleysta, lífræna kolefnisins eða tiltekens efnis í prófunarmiðlinum á tíma t ,
 $C_{bl(0)}$ = upphafsstyrkur uppleysta, lífræna kolefnisins eða tiltekens efnis í blanksýninu,
 $C_{bl(t)}$ = styrkur uppleysta, lífræna kolefnisins eða tiltekens efnis í blanksýninu á tíma t .

31. Niðurbrot er gefið upp sem hundraðshluti fjarlægingar á uppleystu, lífrænu kolefni (endanlegt niðurbrot) eða fjarlægingar á tilteknu efni (frumniðurbrot) á tíma t . Styrkur uppleysts, lífræns kolefnis er reiknaður úr með $0,1 \text{ mg/l}$ nákvæmni og námundað að meðaltal gilda fyrir D_i að næstu heilu prósentu.
32. Ferli niðurbrotsins er sýnt myndrænt á skýringarmynd eins og sýnt er á myndinni í „Gildi og túlkun niðurstaðna“. Ef næg gögn eru til staðar skal reikna upphafsfasann (t_L) og tímann til að ná 50% fjarlægingu frá lokum upphafsfasans (t_{50}) út frá ferlinum.

Prófunarskýrsla

33. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

- eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,
- gögn til sanngreiningar.

Prófunarskýrði:

- staðsetning og lýsing á sýnatökustaðnum; mengunar- og næringarefnaástand (líftala, níturat, ammóníum, fosfat ef við á),
- eiginleikar sýnisins (dagsetning sýnatöku, dýpt, útlit, hitastig, selta, uppleyst, lífrænt kolefni (valkvætt), tíminn milli þess að sýni er tekið þar til það er notað í prófuninni),
- aðferð sem er notuð (ef einhver er) við öldrúna á sjó,
- aðferð sem er notuð við formeðhöndlun (súna/botnfellingu) sjávarins,
- aðferð sem er notuð við ákvörðun á uppleystu, lífrænu kolefni,
- aðferð sem er notuð við sértæka greiningu (valkvætt),
- aðferð sem er notuð við ákvörðun á fjölda ófrumbjarga lífvera í sjó (líftöluaðferð eða önnur aðferð) (valkvætt),
- aðrar aðferðir (valkvætt) sem eru notaðar til að lýsa eiginleikum sjávar (ATP-mælingar, o.s.frv.).

Niðurstöður:

- greiningargögn sem greint er frá á gagnablaði (2. viðbætur),
- ferli niðurbrotsprófunarinnar er sýnt myndrænt á skýringarmynd sem sýnir upphafsfasann (t_L), hallann og tímann (hefst við lok upphafsfasans) sem tekur að ná 50% fjarlægingu (t_{50}). Hægt er að áætla upphafsfasann myndrænt eins og sýnt er á myndinni í liðnum „Gildi og túlkun niðurstaðna“ eða, með hagkvæmum hætti, sem tímann sem þarf til að ná 10% niðurbroti,
- hundraðshluti niðurbrots er mældur eftir 60 daga eða í lok prófunar.

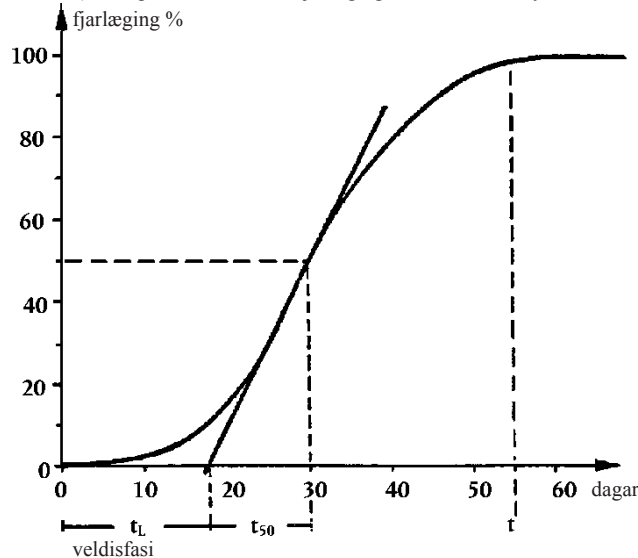
Um fjöllum um niðurstöður:

Gildi og túlkun niðurstaðna

34. Niðurstöður sem fást með viðmiðunarefnum, t.d. natriumbensóati, natriumasetati eða anilíni, skulu vera sambærilegar niðurstöðum sem fást úr hringprófuninni (3. heimild) (sjá hlutann um „Viðmiðunarefni“, 7. lið). Ef niðurstöður sem fást með viðmiðunarefnum eru ódæmigerðar skal endurtaka prófunina með öðru sjávarsýni. Þó að ekki sé alltaf einfalt að túlka niðurstöður úr hömlunarprófunum vegna uppleysta, lífræna kolefnisins í prófunarefninu er umtalsverð lækkun á heildarfjarlægingarhlutfalli uppleysta, lífræna kolefnisins, borið saman við samanburðarsýnið, jákvætt merki um eiturrhif.

35. Vegna hins hlutfallslega háa prófunarstyrks sem er notaður, samanborið við flest náttúruleg kerfi (og af þeim sökum óhagstætt hlutfall milli styrkleika prófunarefnanna og annarra kolefnisgjafa), skal líta svo á að aðferðin sé forprófun sem hægt er að nota til að sýna hvort efni sé auðlífrjótanlegt eða ekki. Til samræmis við það þýða lágar niðurstöður ekki endilega að prófunarefnið sé ekki lífrjótanlegt í sjávarumhverfi heldur gefa þær til kynna að frekari athuganir séu nauðsynlegar til að ákvarða það.

Dæmi um fræðilega niðurbrottilraun sem sýnir æskilega leið til að meta gildi t_L (lengd upphafsfasa) og t_{50} (tímabil sem hefst á t_L), sem þarf til að ná 50% fjarlægingu, er að finna á myndinni hér fyrir neðan.



AÐFERÐ MEÐ LOKAÐRI FLÖSKU

INNGANGUR

1. Þessi aðferð er afbrigði fyrir sjó af prófun í lokaðri flösku (5. heimild) og lokið var við hana í kjölfar niðurstöðu úr hringprófun sem danska Vatnsgæðastofnunin (3. heimild) skipulagði fyrir framkvæmdastjórn Evrópusambandsins.
2. Líkt og í meðfylgjandi hristiflökuaðferð í sjávarumhverfi skal ekki taka niðurstöðurnar úr þessari prófun sem vísbendingar um auðlífrjótanleika heldur skal nota þær sérstaklega til að afla upplýsinga um lífrjótanleika efna í sjávarumhverfi.

MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

3. Fyrirframákvarðað magn prófunarefnisins er leyst upp í prófunarmiðlinum í styrk sem er nemur yfirleitt 2–10 mg af prófunarefni á hvern lítra (hægt er að nota einn eða fleiri styrkleika). Lausnin er geymd í fullri lokaðri flösku í myrkri í baði með stöðugu hitastigi eða klefa með nákvæmni ± 1 °C sem er yfirleitt á bilinu 15–20 °C. Í þessum tilvikum þar sem markmið rannsóknarinnar er að líkja eftir umhverfisaðstæðum er hægt að framkvæma prófanir við annað hitastig en þetta venjulega hitastigsbil að því tilskildu að viðeigandi breytingar séu gerðar varðandi hitastýringu. Niðurbrotinu er fylgt eftir með súrefnisgreiningu í 28 daga.
4. Hringprófunin sýndi að ef prófunin var framlengd umfram 28 daga var í flestum tilvikum ekki hægt að safna neinum gagnlegum upplýsingum vegna alvarlegra truflana. Gildin fyrir lífræna súrefnisþörf (BOD) í blanksýninu voru óhóflega há, að öllum líkindum vegna vaxtar á innra borði, sem orsakast af skorti á hristingi, og nitrunar. Því er mælt með því að lengd prófunarinnar sé 28 dagar en ef gildin fyrir lífræna súrefnisþörfina í blanksýninu eru innan 30% markanna (15. og 40. liður) er hægt að framlengja hana.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

5. Til þess að vita hvort nota megi prófunina á tiltekin efni verða sumir eiginleikar þess vera þekktir. Reynsluformúlan er nauðsynleg til að hægt sé að reikna út fræðilegu súrefniþörfina (ThOD) (sjá 3. viðbæti) annars þarf að ákvarða efnafræðilega súrefniþörf (COD) efnisins svo að hægt sé að nota hana sem viðmiðunargildi. Notkun á efnafræðilegri súrefniþörf er ekki eins fullnægjandi þar sem sum efnin eru ekki oxuð að fullu í prófuninni á efnafræðilegu súrefniþörfinni.
6. Leysni efnisins skal vera a.m.k. 2 mg/l þó að unnt sé, að meginreglu til, að prófa efni með minni leysni (t.d. með órhatíðnihljóðsundrun (e. *ultra sonication*)) sem og rokgjörn efni. Upplýsingar um hreinleika eða innbyrðis hlutföll aðalefniþátta prófunarefnisins eru nauðsynlegar til að hægt sé að túlka niðurstöðurnar, sérstaklega þegar niðurstöðurnar eru nærri því að standast viðmiðunarmörk.
7. Upplýsingar um eiturrhifefnisins á bakteríur, t.d. eins og mælt er í stuttum prófunum á öndun (4. heimild), geta verið mjög gagnlegar til að velja viðeigandi prófunarstyrkleika og geta skipt sköpum fyrir rétta túlkun á lágum gildum fyrir lífniðurbrot. Slíkar upplýsingar eru þó ekki alltaf fullnægjandi til að túlka niðurstöður sem fást úr prófunum á lífniðurbroti og aðferðin, sem lýst er í 27. lið, á betur við.

VIÐMIÐUNAREFNI

8. Nota skal hentug viðmiðunarefni til að fylgjast með virkni örvera í sjávarsýninu. Hægt er að nota (t.d.) anilín, natriumasetat eða natriumbensóat í þessum tilgangi. Niðurbrot þessara efna, sem nemur a.m.k. 60% (af fræðilegri súrefniþörf þeirra), verður að eiga sér stað á tiltölulega stuttum tíma, annars er mælt með að prófunin sé endurtekin með öðru sjávarsýni.
9. Í hringprófun framkvæmdastjórnar Evrópusambandsins þar sem sjávarsýni voru tekin á mismunandi stöðum og á mismunandi árstíma var upphafsfasinn (t_L) og tíminn til að ná 50% niðurbroti (t_{50}), að undanskildum upphafsfasanum, annars vegar 0–2 dagar og hins vegar 1–4 dagar fyrir natriumbensóat. Að því er varðar anilín voru gildin fyrir t_L og t_{50} 0–7 dagar og 2–12 dagar, í þeirri röð.

SAMANBURÐARNÁKVÆMNI

10. Samanburðarnákvæmni aðferðanna var fastsett í hringprófun framkvæmdastjórnar Evrópusambandsins (3. heimild).

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

11. Venjulegur rannsóknarstofubúnaður og:
 - a) hægt er að nota 250–300 ml flöskur, sem í er mæld lífræn súrefniþörf (e. *BOD bottle*), með glertöppum eða 250 ml flösku með þröngum hálsi og glertappa,
 - b) nokkrar flöskur, tveggja, þriggja og fjögurra lítra, með merki fyrir hvern lítra, fyrir undirbúning tilraunarinnar og til að fylla flöskurnar sem í er mæld lífræn súrefniþörf,
 - c) vatnsbað eða herbergi með stöðugu hitastigi til að halda stöðugu hitastigi á flöskunum (± 1 °C), sem útilokar ljós,
 - d) búnaður fyrir greiningu á uppleystu súrefni,
 - e) himnusíur, 0,2–0,45 μm (valkvætt),
 - f) búnaður fyrir sértæka greiningu (valkvætt).

Sjór

12. Tekið er sjávarsýni í ílát sem hefur verið hreinsað vandlega og flutt á rannsóknarstofuna, helst innan sólarhrings eða tveggja daga frá söfnuninni. Á meðan flutningi á stendur skal ekki leyfa hitastigi sýnisins að fara umtalsvert yfir það hitastig sem verður notað í prófuninni.
13. Tilgreina skal sýnatökustaðinn nákvæmlega og lýsa honum m.t.t. mengunar- og næringarefnaástands. Einkum að því er varðar strandsjó eða mengað vatn skal þessi lýsing á eiginleikum innihalda fjölda örveruþyrpinga ófrumbjarga lífvera og ákvörðun á styrk uppleysts nitrats, ammóníums og fosfats.
14. Veita skal eftirfarandi upplýsingar um sjálft sjávarsýnið:
 - dagsetning söfnunar,
 - dýpið sem sýnið er tekið á,
 - útlit sýnis — gruggugt o.s.frv.,
 - hitastig þegar sýnið er tekið,
 - selta,
 - uppleyst, lífrænt kolefni (DOC),
 - tíminn milli þess að sýni er tekið þar til það er notað í prófuninni.
15. Ef innihald uppleysts, lífræns kolefnis í sýninu er mikið eða ef talið er að gildin fyrir lífrænu súrefnisþörfina í blanksýninu eftir 28 daga verði hærri en 30% af viðmiðunarefninu er mælt með því að sjórinn verði látinn standa í u.þ.b. viku áður en hann er notaður.
16. Sýnið er geymt við loftháðar aðstæður við prófunarhitastigið og í myrkri eða dreifðu ljósi. Ef nauðsyn krefur skal viðhalda loftháðum aðstæðum með því að lofta varlega. Við öldrun dregur úr innihaldi auðbrjótanlegra lífrænna efna. Í hringprófuninni (3. heimild) kom ekki í ljós neinn munur á niðurbrotsmöguleikum sjávarsýna eftir öldrun og nýtekinn sjávarsýna.
17. Fyrir notkun skal formeðhöndla sjóinn til að fjarlægja grófar agnir t.d. með síun gegnum nælonsíu eða grófa pappírssíu (ekki himnur eða GF-C síur), eða með botnfellingu og umhellingu. Greina skal frá aðferðinni sem er notuð. Formeðhöndlað eftir öldrun, ef hún er notuð.

Stofnlausnir fyrir steinefni

18. Eftirfarandi stofnlausnir eru tilreiddar með prófefni af greiningarhreinleika:

a)	Kalíumtvívetnisortófosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikalíumhýdrógenortófosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Tvínatríumvetnisortófosfatdihýdrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
	Ammóníumklóríð, (NH_4Cl)	0,50 g
	Leyst upp í eimuðu vatni og fyllt að 1 lítra	
b)	Kalsíumklóríð, CaCl_2	27,50 g
	Leyst upp í eimuðu vatni og fyllt að 1 lítra	

- c) Magnesiumsúlfatseptahýdrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Leyst upp í eimuðu vatni og fyllt að 1 lítra

- d) Járn(III)klóríðhexahýdrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Leyst upp í eimuðu vatni og fyllt að 1 lítra

Hægt er að koma í veg fyrir útfellingu í lausn d) með því að bæta einum dropa af óblandaðri saltsýru eða 0,4 g af etýlendíamíntetraedíksýru (EDTA, dínatríumsalt) í hvern lítra. Ef botnfall myndast í stofnlausn skal skipta henni út fyrir nýtilreidda lausn.

Tilreiðsla á prófunarmiðli

19. Bæta skal 1 ml af hverri stofnlausn hér fyrir ofan í hvern lítra af formeðhöndluðum sjó. Prófunarmiðillinn er mettaður með lofti við prófunarhitastig með því að lofta með hreinu þrýstilofti í u.þ.b. 20 mínútur. Ákvarða skal styrk uppleysta súrefnisins vegna eftirlits. Venslaritið sem fylgir þessari prófunaraðferð (4. viðbætur) sýnir mettunarstyrk uppleysta súrefnisins sem fall af seltu og hitastigi.

Sáð

20. Ekki skal bæta við sérstöku sáði til viðbótar við örverurnar sem þegar eru til staðar í sjónum. Þyrpingarfjöldi ófrumþjarga lífvera í sjávarprófunarmiðlinum er ákvarðaður (valkvætt)(og helst einnig í upprunalega sjávarsýninu) t.d. með líftölu þar sem notað er sjávaragar. Þetta er einkum æskilegt varðandi sýni frá strandsvæðum eða menguðum stöðum. Fylgst er með virkni ófrumþjarga lífvera í sjónum með því að framkvæma prófun með viðmiðunarefni.

Undirbúningur á prófunarflöskum

21. Framkvæma skal allar nauðsynlegar breytingar, þ.m.t. öldrun og formeðhöndlun sjávar, við valið prófunarhitastig á bilinu 15–20 °C þar sem öll glerilát eru hreinsuð en ekki sótthreinsuð.
22. Tilreiða skal hópa af flöskum, sem í er mæld lífræn súrefnisþörf, fyrir ákvörðun á lífrænni súrefnisþörf í prófuninni og á prófunar- og viðmiðunarefnunum í samskeiða tilraunaröðum. Allar greiningar eru gerðar í tveimur eins flöskum (blanksýni, viðmiðunarefni og prófunarefni), þ.e. tvær flöskur eru undirbúnar fyrir hverja ákvörðun. Greiningar eru gerðar a.m.k. á dögum 0, 5, 15 og 28 (fjórar ákvarðanir). Fyrir súrefnisgreiningu þarf fjórar ákvarðanir í heildina $3 \times 2 \times 4 = 24$ flöskur (blanksýni, viðmiðunarefni og prófunarefni) og þar af leiðandi u.þ.b. 8 lítra af prófunarmiðli (fyrir einn styrk af prófunarefni).
23. Aðskildar lausnir prófunarefna og viðmiðunarefna eru tilreiddar í stórum flöskum með nægilegu rúmmáli (11. líður) með því að bæta fyrst við prófunar- og viðmiðunarefnum, annað hvort beint eða með því að nota sterka stofnlausn í stórar flöskur sem eru fylltar að hluta. Prófunarmiðli er bætt við til að fá þann lokastyrk sem óskað er eftir. Ef notaðar eru stofnlausnir prófunarefna og/eða viðmiðunarefna skal tryggja að seltu sjávarmiðilsins sé ekki breytt umtalsvert.
24. Styrkur prófunarefna og viðmiðunarefna er valinn, að teknu tilliti til eftirfarandi:
- a) leysni uppleysts súrefnis í sjó við gildandi prófunarhitastig og seltu (sjá meðfylgjandi venslarit — 4. viðbætur),
 - b) blankildi fyrir lífræna súrefnisþörf sjávar og
 - c) þeim lífbrjótanleika prófunarefnisins sem búist er við.
25. Við 15 °C og 20 °C og 32 prómill seltu (úthafssjó), er leysni uppleysts súrefnis u.þ.b. 8,1 og 7,4 mg/l, í þeirri röð. Súrefnisupptaka sjávarins sjálfs (öndun í blanksýni) getur verið 2 mg O_2 /l eða meira ef sjórinn er ekki látinn standa. Til að tryggja að marktækur súrefnisstyrkur sé til staðar eftir oxun prófunarefnisins skal því upphafsstyrkur prófunarefnisins vera u.þ.b. 2–3 mg/l (með hliðsjón af fræðilegri súrefnisþörf) fyrir efnin sem gert er ráð fyrir að brotni niður að fullu við prófunarskilyrðin (s.s. viðmiðunarefni). Efni, sem brotna minna niður, eru prófuð við hærri styrk, allt að u.þ.b. 10 mg/l, að því tilskildu að það leiði ekki til eiturrhifa. Það kann að vera hagstætt að keyra samhliða prófanir við lágan (u.þ.b. 2 mg/l) og háan (u.þ.b. 10 mg/l) styrk prófunarefnis.

26. Ákvarða skal blankgildi fyrir súrefni samhliða í flöskum sem innihalda hvorki prófunarefni né viðmiðunarefni.
27. Ef ákvarða á hamlandi áhrif skal tilreiða eftirfarandi röð lausna í aðskildum stórum flöskum (13. liður):
- 2 mg á hvern lítra af efni sem brotnar auðveldlega niður, t.d. eitthvert þeirra viðmiðunarefna sem getið er,
 - x mg á hvern lítra af prófunarefni (x er yfirleitt 2),
 - 2 mg á hvern lítra af efni sem brotnar auðveldlega niður auk x mg á hvern lítra af prófunarefni.

Eðlisefnafræðileg samanburðarprófun (valkvætt)

28. Ef valið er að nota sértæka greiningu er hægt að framkvæma eðlisefnafræðilega tilraun til að kanna hvort ólífræn ferli fjarlægi prófunarefnið, s.s. vatnsrof eða ásóg. Hægt er að framkvæma eðlisefnafræðilega samanburðarprófun með því að bæta kvikasilfurs(II)klóríði (HgCl_2)⁽¹⁴⁾ (50–100 mg/l) í tvær eins flöskur með prófunarefninu til að stöðva virkni örvera. Marktæk minnkun á styrk tiltekins efnis í prófuninni gefur vísbendingar um ólífræn fjarlægingarferli.

Fjöldi flaskna, sem í er mæld lífræn súrefnisþörf, í dæmigerðri prófun

29. Í dæmigerðri prófun eru eftirfarandi flöskur notaðar:
- a.m.k. 8 sem innihalda prófunarefni,
 - a.m.k. 8 sem innihalda eingöngu næringarefnabættan sjó,
 - a.m.k. 8 sem innihalda viðmiðunarefni, og, ef nauðsyn krefur
 - 6 flöskur sem innihalda prófunarefni og viðmiðunarefni (eiturrhifasamanburður).

VERKFERLI

30. Eftir tilreiðslu skal tafarlaust sjúga hverja lausn með vökvasugu úr neðri fjórðungi (ekki af botninum) viðeigandi stórrar flösku til að fylla viðkomandi flokk flaskna sem í er mæld lífræn súrefnisþörf. Greina skal núllsamanburðinn strax (tímupunkturinn núll) m.t.t. uppleysts súrefnis (33. liður) eða varðveita til efnagreiningar síðar meir með útfellingu með MnCl_2 (mangan(II)klóríði) og NaOH (natríumhýdroxíði).
31. Hliðstæðu flöskurnar, sem í er mæld lífræn súrefnisþörf, sem eftir eru, eru settar í ræktun við prófunarhitastigið (15–20 °C), hafðar í myrkri og fjarlægðar af ræktunarsvæðinu með hæfilegu millibili (t.d. eftir 5, 15 og 28 daga að lágmarki) og settar í greiningu m.t.t. uppleysts súrefnis (33. liður).
32. Sýni fyrir sértæka greiningu (valkvætt) eru himnusíuð (0,2–0,45 μm) eða skilin í skilvindu í 15 mínútur. Sýnin eru geymd í allt að 48 klst. við 2–4 °C eða við –18 °C í lengri tíma ef þau eru ekki greind strax (ef vitað er að prófunarefnið helst óbreytt er sýrt að pH-gildinu 2 fyrir geymslu).

Ákvörðun á uppleystu súrefni

33. Styrkur uppleysta súrefnisins er ákvarðaður með því að nota efnafræðilegar eða rafefnafræðilegar aðferðir sem eru viðurkenndar á landsvísu eða á alþjóðavettvangi.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

34. Greiningarniðurstöður eru skráðar á meðfylgjandi gagnablöð (5. viðbætur).

⁽¹⁴⁾ Kvikasilfurs(II)klóríð (HgCl_2) er mjög eitrað efni sem skal meðhöndla samkvæmt viðeigandi varúðarráðstöfunum. Farga skal vatnskendum úrgangi sem inniheldur þetta iðefni á viðeigandi hátt; ekki skal losa hann beint út í skólperfið.

35. Lífræn súrefnisþörf er reiknuð út sem mismunur á súrefnisþurrð milli blanksýnis og lausnar prófunarefnis við prófunarskilyrðin. Deilt er í nettósúrefnisþurrð með styrk (massi miðað við rúmmál) efnisins til að gefa lífræna súrefnisþörf upp sem mg af lífrænni súrefnisþörf á mg af prófunarefni. Niðurbrotið er skilgreint sem hlutfallið milli lífrænnar súrefnisþarfar og annað hvort, helst, fræðilegu súrefnisþarfarinnar eða efnafræðilegu súrefnisþarfarinnar og gefið upp sem hundraðshluti (sjá 36. lið).
36. Gildi fyrir lífniðurbrot eru reiknuð út fyrir hvern sýnatökutíma, bæði fyrir prófunarefni og viðmiðunarefni, samkvæmt annarri af eftirfarandi jöfnum:

$$\% \text{ lífniðurbrot} = \frac{\text{mgO}_2 / \text{mg prófað efni}}{\text{mg ThOD} / \text{mg prófað efni}} \times 100$$

$$\% \text{ lífniðurbrot} = \frac{\text{mgO}_2 / \text{mg prófað efni}}{\text{mg COD} / \text{mg prófað efni}} \times 100$$

þar sem:

ThOD = fræðileg súrefnisþörf (útreikningur, 3. viðbætur)

COD = efnafræðileg súrefnisþörf, ákvörðuð með tilraunum.

Athugasemd: Stundum koma mismunandi niðurstöður út úr þessum tveimur útreikningum (hundraðshluti fræðilegrar súrefnisþarfar (ThOD) eða hundraðshluti efnafræðilegrar súrefnisþarfar (COD)) en þá er æskilegt að nota fræðilegu súrefnisþörfina þar sem sum efni eru ekki oxuð að fullu í prófuninni á efnafræðilegri súrefnisþörf.

37. Ferli niðurbrotsprófunarinnar er sýnt myndrænt á skýringarmynd (sjá dæmi í liðnum um „Gildi og túlkun niðurstaðna“). Ef næg gögn eru til staðar skal reikna upphafsfasann (t_L) og tímunn (t_{50}) til að ná 50% fjarlægingu frá lokum upphafsfasans út frá ferlinum fyrir lífniðurbrot.
38. Ef notuð er sértæk greining (valkvætt) skal tiltaka hundraðshluta frumniðurbrots sem hundraðshluta af fjarlægingu tiltekins efnis innan prófunartímabilsins (leiðrétt fyrir blanksýni til greiningar).

Prófunarskýrsla

39. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

- eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,
- gögn til sanngreiningar.

Prófunarskilyrði:

- staðsetning og lýsing á sýnatökustaðnum; mengunar- og næringarefnaástand (líftala, níturat, ammóníum, fosfat ef við á),
- eiginleikar sýnisins (dagsetning sýnatöku, dýpt, útlit, hitastig, selta, uppleyst, lífrænt kolefni (valkvætt), tíminn milli þess að sýni er tekið þar til það er notað í prófuninni),
- aðferð sem er notuð (ef einhver er) við öldrun á sjó,
- aðferð sem er notuð við formeðhöndlun (síun/botnfellingu) sjávarins,
- aðferð sem er notuð við ákvörðun á efnafræðilegri súrefnisþörf (ef hún er gerð),
- aðferð sem er notuð við mælingar á súrefni,
- dreifilausnaraðferð fyrir efni sem eru torleysanleg við prófunarskilyrðin,
- aðferð sem er notuð við ákvörðun á fjölda ófrumbjarga lífvera í sjó (líftöluáðferð eða önnur aðferð),

- aðferð sem er notuð við ákvörðun á uppleystu, lífrænu kolefni í sjó (valkvætt),
- aðferð sem er notuð við sértæka greiningu (valkvætt),
- aðrar valkvæðar aðferðir sem eru notaðar til að lýsa eiginleikum sjávarins (ATP-mælingar, o.s.frv.).

Niðurstöður:

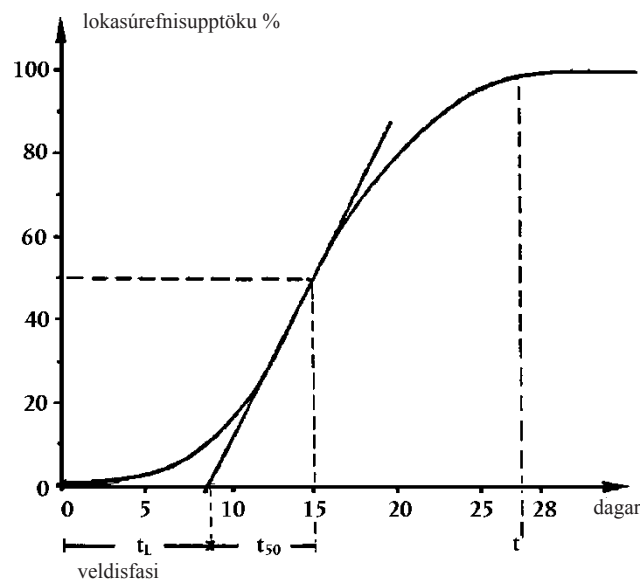
- greiningargögn sem greint er frá á gagnablaði (meðfylgjandi, 5. viðbætur),
- ferli niðurbrotsprófunarinnar er sýnt myndrænt á skýringarmynd sem sýnir upphafsfasann (t_L), hallann og tímenn (hefst við lok upphafsfasans) sem tekur að ná 50% af lokasúrefnisupptöku vegna oxunar prófunarefnisins (t_{50}). Hægt er að áætla upphafsfasann myndrænt eins og sýnt er á meðfylgjandi mynd eða, með hagkvæmum hætti, sem tímenn sem þarf til að ná 10% niðurbroti,
- prósentu niðurbrots, mælt eftir 28 daga.

Umfjöllun um niðurstöður:

Gildi og túlkun niðurstaðna

40. Öndun í blanksýni skal ekki fara yfir 30% af súrefninu í prófunarflöskunni. Ef ekki er hægt að uppfylla þessa viðmiðun með nýteknum sjó verður að láta sjóinn standa (stöðga) fyrir notkun.
41. Hafa skal í huga þann möguleika að efni sem innihalda köfnunarefni geta haft áhrif á niðurstöðurnar.
42. Niðurstöður sem fást með viðmiðunarefnum natriumbensóati og anilíni skulu vera sambærilegar niðurstöðunum sem fást úr hringprófuninni (3. heimild) (9. liður). Ef niðurstöður sem fást með viðmiðunarefnum eru ódæmigerðar skal endurtaka prófunina með öðru sjávarsýni.
43. Prófunarefnið getur talist hafa hamlandi áhrif á bakteríur (við styrkinn sem er notaður) ef lífræn súrefnisþörf blöndunnar af viðmiðunar- og prófunarefnum er minni en summa lífrænnar súrefnisþarfar í aðskildum lausnum þessara tveggja efna.
44. Vegna hins hlutfallslega háa prófunarstyrks, samanborið við flest náttúruleg kerfi og af þeim sökum óhagstætt hlutfall milli styrkleika prófunarefnanna og annarra kolefnisgjafa, skal líta svo á að aðferðin sé forprófun sem hægt er að nota til að sýna hvort efni sé auðlífbrjótanlegt eða ekki. Til samræmis við það þýða lágur niðurstöður ekki endilega að prófunarefnið sé ekki lífbrjótanlegt í sjávarumhverfi heldur gefa þær til kynna að frekari athuganir séu nauðsynlegar til að ákvarða það.

Dæmi um fræðilega niðurbrotstilraun sem sýnir æskilega leið til að meta gildi t_L (lengd upphafsfasa) og t_{50} tímabil (sem hefst á t_L), sem þarf að ná 50% af lokasúrefnisupptöku vegna oxunar prófunarefnisins, er að finna hér á eftir:



HEIMILDIR

- 1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.
 - 2) Kaffli C.4-B í þessum viðauka: Ákvörðun á auðlífbrotanleika, III hluti, breytt OECD-skimunarprófun
 - 3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.
 - 4) Kaffli C.11 í þessum viðauka. Lífnidurbrot — öndunarhömlun í virkri seyru
 - 5) Kaffli C.4-E í þessum viðauka: Ákvörðun á auðlífbrotanleika, IV. hluti. Prófun í lokaðri flösku.
-

*I. viðbætur***Ákvörðun á lífrænu kolefni í sjó****HRISTIFLÖSKUAÐFERÐ**

Til að ákvarða lífrænt kolefni í vatnssýni eru lífrænu kolefnin í sýninu oxuð í koltvísýring, yfirleitt með því að nota eina af eftirfarandi þremur aðferðum:

- blautoxun með persúlfati/útfjólublárrí geislun
- blautoxun með persúlfati/hækkuðu hitastigi (116–130 °C)
- bruna.

Magngreining á losuðum koltvísýringi er framkvæmd með notkun á innrauðri litrófsgreiningu eða títrunarmælingu. Að öðrum kosti skal afoxa koltvísýring í metan sem er magngreint með logajónunarnema (FID).

Aðferðin með persúlfati/útfjólublárrí geislun er yfirleitt notuð við greiningu á „hreinu“ vatni sem inniheldur lítið af efnisögnum. Seinni aðferðin er hægt að nota á flestar tegundir vatnssýna en oxun með persúlfati/hækkuðu hitastigi hentar best fyrir sýni af vægum styrk og brennslutæknin er nothæf fyrir sýni þar sem innihald órokgjarnra lífrænna kolefna er vel yfir 1 mg C/l.

Truflanir

Allar aðferðir þrjár eru háðar því að fjarlægja eða vega upp á móti ólífrænu kolefni sem er fyrir hendi í sýninu. Hreinsun koltvísýrings úr sýrða sýninu er sú aðferð sem er oftast notuð við að fjarlægja ólífræna kolefnið jafnvel þó að þetta leiði einnig til þess að rokgjörn, lífræn efnasambönd tapast (1. heimild). Fyrir hvern sýnaefnivíð þarf að tryggja að ólífrænt kolefni sé fjarlægt algerlega eða vegið upp á móti því og ákvarða skal rokgjörn, lífræn kolefni auk órokgjarnra lífrænna kolefna, háð tegund sýnisins.

Hár klóríðstyrkur leiðir til minni oxunarskilvirkni þegar aðferðin með persúlfati/útfjólublárrí geislun er notuð (2. heimild). Notkun á oxunarprófefti, sem er breytt með því að bæta við kvikasilfurs(II)nítrati, getur hins vegar fjarlægt þessa truflun. Mælt er með því að ásættanlegt hámarks magn sýnis sé notað til að meta hverja tegund sýnis sem inniheldur klóríð. Hár saltstyrkur í sýni, sem greint er með brennsluáðferðinni, getur valdið salthjúpi á hvatanum og mikilli tæringu í brennslurörinu. Gera skal varúðarráðstafanir samkvæmt handbók framleiðanda.

Þegar aðferðin með persúlfati/útfjólublárrí geislun er notuð getur vantað upp á að sýni sem eru mjög gruggug sem og sýni sem innihalda efnisagnir séu fullkomlega oxuð.

Dæmi um heppilega aðferð

Órokgjarnt lífrænt kolefni er ákvarðað með oxun með persúlfati/útfjólublárrí geislun og síðan magnákvörðun á losuðum koltvísýringi með því að nota ódreifna, innrauða litrófsgreiningu.

Oxunarprófeftinu er breytt í samræmi við tillögurnar í 2. heimild eins og lýst er í handbók framleiðanda:

- a) 8,2 g HgCl_2 og 9,6 g $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ er leyst upp í nokkur hundruð millilítrum af prófeftisvatni með lágum kolefnisstyrk
- b) 20 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ eru leyst upp í kvikasilfursaltlausninni
- c) 5 ml HNO_3 (styrkur) er bætt við blönduna
- d) prófeftið er þynnt að 1000 ml.

Trufflanir frá klóríði eru fjarlægðar með því að nota 40 µl af magni sýnisins fyrir 10% klóríð og 200 µl af magni sýnisins fyrir 1,9% klóríð. Hægt er að greina sýni með háum klóríðstyrk og/eða meira magn af sýni samkvæmt þessari aðferð að því tilskildu að komið sé í veg fyrir að klóríð safnist upp í oxunarílatínu. Eftir það er hægt að ákvarða roksgjarnt lifrænt kolefni fyrir viðkomandi tegund sýnis, ef við á.

HEIMILDIR

- 1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.
- 2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Einnig áhugavert (gefin er lýsing á sjálfvirku greiningarkerfi):

- 3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. *Hydrobiological Bulletin* 12, 137-142.

2. viðbætur

Lífniðurbrot í sjó

HRISTIFLÖSKUAÐFERÐ

GAGNABLAÐ

1. RANNSÓKNARSTOFA:

2. DAGSETNING VIÐ UPPHAF PRÓFUNAR:

3. PRÓFUNAREFNI:

Heiti:

Styrkur stofnlausnar: mg/l sem efni

Upphafsstyrkur í miðli, t_0 : mg/l sem efni: mg uppleyst, lífrænt
kolefni/l

4. SJÓR:

Uppspretta:

Dagsetning söfnunar:

Dýpið sem sýnið er tekið á:

Útlit við söfnun (t.d. gruggugt o.s.frv.):

Selta við söfnun: ‰

Hitastig við söfnun: °C

Uppleyst, lífrænt kolefni „x“ klst. eftir söfnun: mg/l

Formeðhöndlun fyrir prófun (t.d. síun, botnfelling, öldrun o.s.frv.):

Fjöldi örveruþyrpinga — upphaflegt sýni: þyrpingar/ml

— við upphaf prófunar: þyrpingar/ml

Aðrir eiginleikar:

5. ÁKVARÐANIR Á KOLEFNI:

Kolefnisgreiningartæki:

	Flaska nr.		uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) eftir n daga (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Prófun: næringarefna- bættur sjór með prófunar- efni	1	a ₁					
		a ₂					
		meðaltal, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		meðaltal, C _{b(t)}					
Blanksýni: næringarefna- bættur sjór án prófunar- efnis	1	c ₁					
		c ₂					
		meðaltal, C _{c(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		meðaltal, C _{d(t)}					
	meðaltal, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. MAT Á ÓUNNUM GÖGNUM:

Flaska nr.	Útreikningur á niðurstöðum	% niðurbrot eftir n daga				
		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				
Meðaltal (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Ekki skal nota meðaltal af D₁ og D₂ ef á þeim er umtalsverður munur.

Athugasemd: Svipaða framsetningu má nota þegar niðurbroti er fylgt eftir með sértækri greiningu og fyrir viðmiðunarefnið og eiturhrifasamanburðinn.

7. NIÐURBROT ÁN TILSTILLIS LÍFVERA (valkvætt)

	Tími (dagar)	
	0	t
styrkur uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (mg/l) í dauðhreinsuðum samanburði	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ niðurbrot án tilstillis lífvera} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

3. viðbætur

Útreikningur á fræðilegri lífrænni súrefnisþörf

AÐFERÐ MEÐ LOKADRI FLÖSKU

Fræðileg súrefnisþörf efnisins $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ með sameindaþyngdina MW er reiknuð út í samræmi við:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^m} - o \right]}{MW}$$

Þessi útreikningur felur í sér að C sundrast í CO_2 , H í H_2O , P í P_2O_5 og Na í Na_2O . Halógen er fjarlægt sem hýdrógenhalíð og köfnunarefni sem ammoníak.

Dæmi:

Glúkósi $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg glúkósi}$$

Sameindaþyngdir annarra salta en alkalímálma eru reiknaðar út frá þeirri forsendu að söltin hafi verið vatnsrofin.

Brennisteinn er talinn oxast að oxunarstigi + 6.

Dæmi:

Natríum n-dódekýlbensensúlfónat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg efni}$$

Ef um er að ræða efni sem innihalda köfnunarefni er hægt að fjarlægja köfnunarefnið sem ammoníak, nítrít eða nítrat, samsvarandi mismunandi fræðilegum lífrænum súrefnisþörfum.

$$ThOD_{NO_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - d) + 3s + \frac{1}{2^k} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^m} - o \right]}{MW}$$

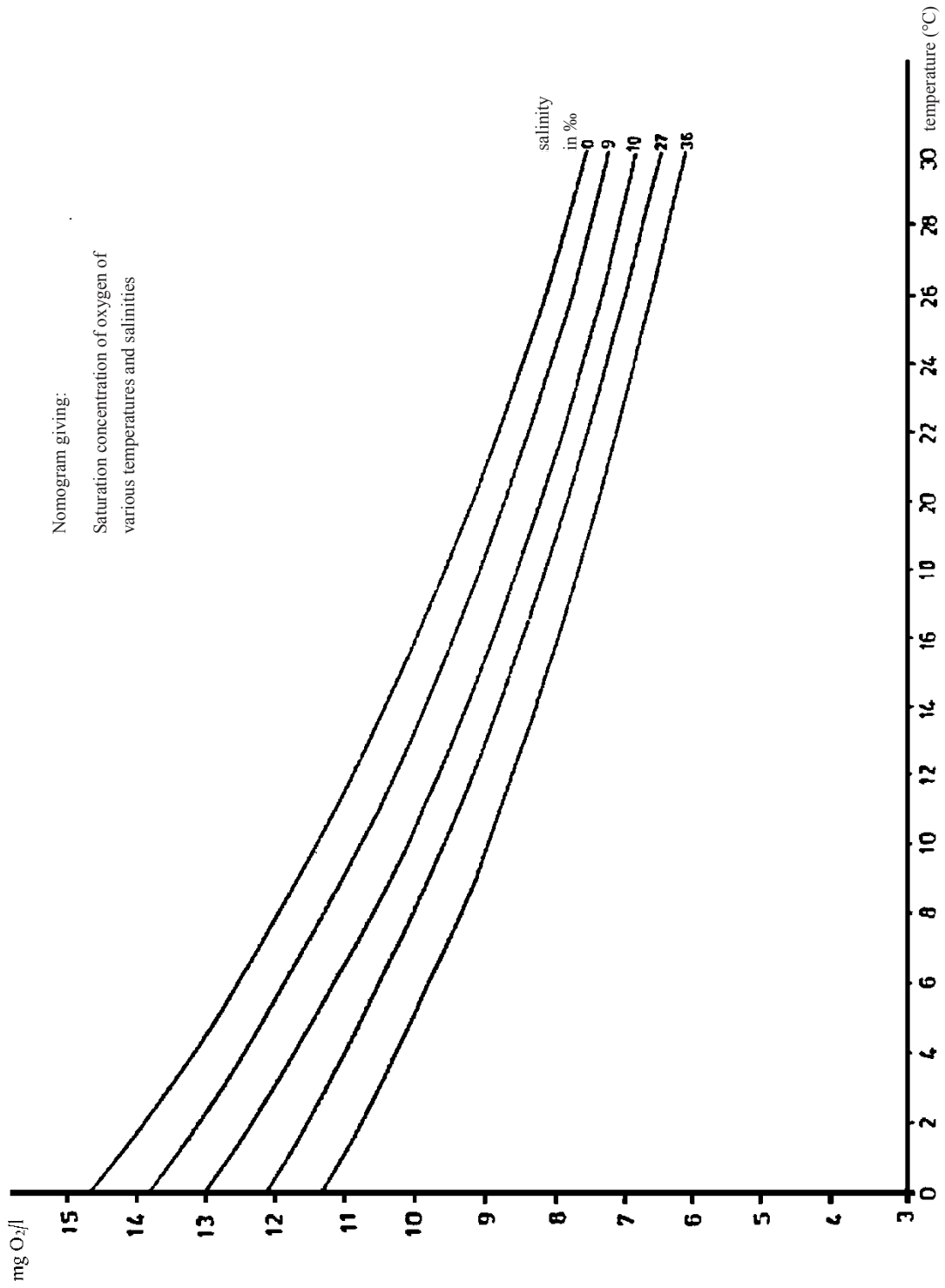
$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - d) + 3s + \frac{5}{2^k} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^m} - o \right]}{MW}$$

Ef alger nítratmyndun hefur komið í ljós við greiningu, ef um er að ræða annars stigs amin:

 $(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg efni}$$

4. viðbætur



5. viðbætur

Lífniðurbrot í sjó

AÐFERÐ MEÐ LOKAÐRI FLÖSKU

GAGNABLAÐ

1. RANNSÓKNARSTOFA:

2. DAGSETNING VIÐ UPPHAF PRÓFUNAR:

3. PRÓFUNAREFNI:

Heiti:

Styrkur stofnlausnar: mg/l

Upphaflegur styrkur í sjávarmiðli: mg/l

fræðileg súrefnisþörf (ThOD) eða efnafræðileg súrefnisþörf (COD): mg O₂/mg prófunarefnis

4. SJÓR:

Uppspretta:

Dagsetning söfnunar:

Dýpið sem sýnið er tekið á:

Útlit við söfnun (t.d. gruggugt o.s.frv.):

Selta við söfnun: ‰

Hitastig við söfnun: °C

Upplest, lífrænt kolefni „x“ klst. eftir söfnun: mg/l

Formeðhöndlun fyrir prófun (t.d. síun, botnfelling, öldrun o.s.frv.):

Fjöldi örveruþyrpinga — upphaflegt sýni: þyrpingar/ml

— við upphaf prófunar: þyrpingar/ml

Aðrir eiginleikar:

5. PRÓFUNARMÍÐILL:

Hitastig eftir loftun: °C

styrkur O₂ eftir loftun og bið áður en prófun hefst: mg O₂/l

6. ÁKVÖRÐUN Á UPPLEYSTU SÚREFNI (DO):

Aðferð: Winkler/rafskaut

	Flaska nr.		mg O ₂ /l eftir n daga			
			0	5	15	28
Prófun: næringarefnabættur sjór með prófunarefni	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Meðaltal prófunar	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Flaska nr.		mg O ₂ /l eftir n daga			
			0	5	15	28
Blanksýni: næringarefnabættur sjór en án prófunarefnis	1	c ₁				
	2	c ₂				
	Meðaltal blanksýnis	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Athugasemd: Svipaða framsetningu má nota fyrir viðmiðunarefni og eiturhrifasamanburð.

7. EYÐING UPPLEYSTS SÚREFNIS: % NIÐURBROT (% D):

	eyðing uppleysts súrefnis eftir n daga		
	5	15	28
$(m_b - m_i)$ ⁽¹⁾			
$\%D = \frac{(m_b - m_i) \text{ } ^{(1)}}{\text{prófunarefni (mg /l)} \times \text{ThOD}} \times 100$			

- (¹) Þarna er gengið út frá því að $m_{b(0)} = m_{i(0)}$, þar sem
 $m_{b(0)}$ = blankgildi á degi 0
 $m_{i(0)}$ = gildi prófunarefnis á degi 0.
 Ef $m_{b(0)}$ er ekki jafnt $m_{i(0)}$ skal nota $(m_{i(0)} - m_{i(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$, þar sem
 $m_{b(x)}$ = blankgildi á degi x
 $m_{i(x)}$ = gildi prófunarefnis á degi x.

C.43. LÍFBRJÓTANLEIKI LÍFRÆNNA EFNA Í NIÐURBROTINNI SEYRU VIÐ LOFTFIRRÐAR AÐSTÆÐUR: MEÐ MÆLINGU Á GASMYNDUN

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 311 um prófanir (2006). Til er fjöldi skimunarprófana til að meta lífbrjótanleika lífrænna efna við loftháðar aðstæður (prófunaraðferðir C.4, C.9, C.10, og C.11, 1. heimild, og OECD-viðmiðunarregla um prófanir 302C, 2. heimild) og niðurstöðurnar af notkun þeirra hafa verið notaðar með góðum árangri til að spá fyrir um afdrif efna í loftháðu umhverfi, einkum í loftháðum stigum skólphreinsunar. Ýmsir hlutar vatnsóleysanlegra efna, sem og þeir sem ásogast á föst efni í skólpi, fá einnig loftháða meðferð þar sem þeir eru til staðar í botnföllnu skólpi. Hins vegar er meiri hluti þessara efna bundinn botnfeldri seyru úr fyrsta þreps hreinsun sem er aðskilin frá óhreinsuðu skólpi í botnfellingarþrótt áður en botnföllna skólpið eða flotid er meðhöndlað með loftháðum hætti. Seyran, sem inniheldur sum leysanlegu efnin í millivatninu fer svo áfram í hitaða niðurbrotstanka þar sem hún fer í loftfirrða meðhöndlun. Enn sem komið er eru engar prófanir í þessari röð sem meta lífbrjótanleika við loftfirrðar aðstæður í loftfirrðum niðurbrotstönkum og þessi prófun miðar að því að fylla það tómarúm; hún á ekki endilega við um önnur súrefnissnauð umhverfishólf.
2. Tækni sem felur í sér öndunarprófun og mælir magn gasmyndunar við loftfirrðar aðstæður, einkum metans (CH_4) og koltvísýrings (CO_2), hefur verið notuð með góðum árangri við mat á lífbrjótanleika við loftfirrðar aðstæður. Birch o.fl (3. heimild) endurskoðuðu þær aðferðir og komust að þeirri niðurstöðu að verk Shelton og Tiedje (4. heimild), sem byggja á fyrri rannsóknum (5.–7. heimild), væru ítarlegast. Aðferðin (4. heimild), sem aðrir þróðu áfram (8. heimild) og er orðin að stöðlum sem notaðir eru í Bandaríkjunum, (9. og 10. heimild), leysti ekki vandamál tengd mismunandi leysni koltvísýrings og metans í prófunarmiðlinum og útreikningi á fræðilegri gasmyndun prófunarefnisins. Í skýrslu Evrópumíðstöðvar rannsókna á umhverfiseiturhrifum og eiturefnafræði (3. heimild) var mælt með viðbótarmælingu á uppleystu ólífrænu kolefnisinnihaldi (DIC) flotsins sem varð til þess að tæknin nýttist á fleiri sviðum. Gerð var alþjóðleg kvörðunarprófun (eða hringprófun) á aðferð Evrópumíðstöðvar rannsókna á umhverfiseiturhrifum og eiturefnafræði sem varð svo ISO-staðall, ISO 11734 (11. heimild).
3. Þessi prófunaraðferð, sem er byggð á ISO 11734 (11. heimild), lýsir skimunaraðferð sem notuð er til að meta mögulegan lífbrjótanleika lífrænna efna við sérstakar aðstæður (þ.e. í loftfirrðum niðurbrotstanki á ákveðnum tíma og með örveruþéttni á ákveðnu bili). Þar sem þynnt seyra er notuð með tiltölulega háum styrkleika prófunarefnis, og prófunin varir að jafnaði lengur en sem nemur viðstöðutíma í loftfirrðum niðurbrotstönkum, eru prófunarskilyrðin ekki endilega í samræmi við skilyrði í loftfirrðum niðurbrotstönkum og nýtast ekki heldur vegna mats á lífbrjótanleika lífrænna efna við loftfirrð skilyrði við annars konar umhverfisaðstæður. Seyra er látin verða fyrir váhrifum af prófunarefninu í allt að 60 daga, sem er lengra en hefðbundinn viðstöðutími seyru (25 til 30 dagar) í loftfirrðum niðurbrotstönkum, þótt viðstöðutímar geti verið mun lengri í iðnaðarstöðvum. Þess vegna er ekki unnt að spá með jafn sannfærandi hætti á grundvelli niðurstaðna úr þessari prófun eins og unnt er þegar um er að ræða loftháð lífníðurbrot, þar sem vísbendingar sem safnað hefur verið um hegðun prófunarefnanna í prófunum á loftháðu „auðveldu“ niðurbroti og í hermiprófunum og loftháða umhverfið nægja til að segja til um af öryggi að tengsl séu fyrir hendi; fáar sambærilegar vísbendingar eru fyrir hendi að því er varðar loftfirt umhverfi. Gera má ráð fyrir að fullkomið loftfirt lífníðurbrot verði ef 75%–80% fræðileg gasmyndun næst. Í þessum prófunum eru notuð há hlutföll efnis á móti lífmassa og það þýðir að efni sem fer í gegn er líklegra til að brotna niður í loftfirrðum niðurbrotstanki. Auk þess er ekki víst að efni, sem ekki breytast í gas í prófuninni, haldist óbreytt í raunhæfara umhverfi og hlutfalli efnis og lífmassa. Einnig geta efni brotnað niður, a.m.k. að hluta til, í öðrum loftfirrðum efnahvörfum sem verða, t.d. með afklórur, en þessi prófun greinir ekki slík efnahvörf. Með því að beita sértækum greiningaraðferðum við ákvörðun á prófunarefninu er þó hægt að fylgjast með brotthvarfi þess (sjá 6., 30., 44. og 53. lið)

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

4. Þvegin niðurbrotin seyra ⁽¹⁵⁾ með lágum (< 10 mg/l) styrkleikum ólífræns kolefnis (IC) er þynnt u.þ.b. tífalt þar til styrkur fastra efna í heild sinni nær 1 til 3 g/l og ræktuð við 35 °C ± 2 °C í lokuðum ílátum með prófunarefninu í

⁽¹⁵⁾ Niðurbrotin seyra er blanda af botnföllnum stigum skólps og virkri seyru sem hefur verið ræktuð í loftfirrðum niðurbrotstanki við u.þ.b. 35 °C til að minnka lífmassa og lyktarvanda og til að bæta getu seyrunnar til að afvatnast. Hún samanstendur af samfélagi loftfælina gerjunar- og metanmyndandi bakteria sem mynda koltvísýring og metan (11. heimild).

magninu 20 til 100 mg C/l í allt að 60 daga. Taka skal tillit til frávika í mælingum á virkni seyrunnar með því að gera samhliða samanburðarblankprófanir með sáði úr seyrinni og í miðlinum en án prófunarefnisins.

5. Mæld er aukning kollrúmsþrýstings í ílátunum sem stafar af myndun koltvísýrings og metans. Mikið af þeim koltvísýringi sem myndast leysist upp í fljótandi fasanum eða umbreytist í karbónat eða vetniskarbónat við prófunarskilyrðin. Þetta ólífræna kolefni er mælt við lok prófunarinnar.
6. Magn kolefnis (ólífræns og metans) sem myndast vegna lífniðurbrots prófunarefnisins er reiknað út frá nettómyndun gass og nettómyndun ólífræns kolefnis í fljótandi fasanum umfram gildi samanburðarblanksýna. Umfang lífniðurbrots er reiknað út frá heildarmagni myndaðs ólífræns kolefnis og kolefnis í metani sem hundraðshluti af mældu eða reiknuðu kolefnismagni sem er bætt við sem prófunarefni. Hægt er að fylgjast með ferli lífniðurbrotsins með því að gera millimælingar á gasmyndun eingöngu. Auk þess er hægt að ákvarða frumlífniðurbrot með sértækum greiningum við upphaf eða lok prófunarinnar.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

7. Hreinleiki, vatnsleysni, rokgirni og ásogseiginleikar prófunarefnisins þurfa að vera þekkt til að unnt sé að túlka niðurstöðurnar á réttan hátt. Lífrænt kolefnisinnihald (% þyngdarhlutfall (w/w)) prófunarefnisins þarf að vera þekkt, annaðhvort út frá efnafræðilegri byggingu þess eða með mælingum. Að því er varðar rokgjörn prófunarefni er gagnlegt að nota mældan eða reiknaðan fasta samkvæmt lög máli Henrys við ákvörðun á því hvort prófunin á við. Upplýsingar um eiturrhif prófunarefnisins á loftfælnar bakteríur eru gagnlegar við val á viðeigandi prófunarstyrk og við túlkun á niðurstöðum sem sýna lélegan lífbrjótanleika. Mælt er með því að hafa líka samanburðarprófun með hömlun nema vitað sé að prófunarefnið hafi ekki hamlandi áhrif á virkni loftfælna örvera (sjá 21. lið og ISO 13641-1, 12. heimild).

NOTKUNARSVIÐ PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

8. Nota má prófunaraðferðina á vatnsleysanleg efni, hana má einnig nota á torleysanleg og óleysanleg efni að því tilskildu að notuð sé aðferð með nákvæmri skömmtun, sjá t.d. ISO 10634 (13. heimild). Almennt séð er nauðsynlegt að ákvörðun sé tekin í hverju tilviki fyrir sig ef um er að ræða rokgjörn efni. Ef til vill þarf að gera sérstakar ráðstafanir, t.d. að losa ekki gas meðan á prófuninni stendur.

VIÐMIÐUNAREFNI

9. Til þess að fylgjast með ferlinu er gerð prófun á viðmiðunarefni með því að setja upp viðeigandi ílát samhliða sem hluta af hefðbundinni prófunarkeyrslu. Fenól, natríumbensóat og pólýetýlenglýkól 400 eru dæmi um viðmiðunarefni og vænta má að þau brotni niður um meira en 60% af fræðilegri gasmyndun (þ.e. metan og ólífrænt kolefni) á innan við 60 dögum (3. og 14. heimild).

SAMANBURÐARNÁKVÆMNI PRÓFUNARNIÐURSTAÐNA

10. Í alþjóðlegri hringprófun (14. heimild) var góð samanburðarnákvæmni í gasþrýstingsmælingum fyrir þrjú prófunarílát. Hlutfallslegt staðalfrávik (fráviksstuðull) var oftast undir 20% jafnvel þótt þetta gildi hækkaði oft í > 20% ef eiturfefni voru til staðar eða nær lokum 60 daga ræktunartímabilsins. Meiri frávik fundust einnig í ílátum með < 150 ml rúmmáli. Endanleg pH-gildi í prófunarmiðlinum voru á bilinu 6,5–7,0.

11. Eftirfarandi niðurstöður fengust við hringprófunina.

Prófunarefni	Heildar-gögn n_1	Meðaltal niðurbrots (heildargögn) (%)	Hlutfallslegt staðalfrávik (heildargögn) (%)	Gild gögn n_2	Meðaltal niðurbrots (gild gögn) (%)	Hlutfallslegt staðalfrávik (gild gögn) (%)	Gögn > 60% niðurbrot í gildum prófunum n_3
Palmitínsýra	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70% (*)
Pólýetýlenglýkól 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83% (*)

(*) Hlutfall n_2

12. Frávíksstuðlar meðaltals fyrir öll gildi sem fengin eru með palmitínsýru og pólýetýlenglýkóli 400 voru allt að 45% (n = 36) og 35% (n = 38) í hvoru tilviki fyrir sig. Ef undanskilin voru gildi sem voru < 40% og > 100% (hið fyrra talið vera vegna of lakra skilyrða, hið síðara af óþekktum ástæðum) voru frávíksstuðlar lækkaðir niður í 26% annars vegar og 23% hins vegar. Þeir hlutar „gilda“ gilda, sem ná a.m.k. 60% niðurbroti, voru 70% fyrir palmitínsýru og 83% fyrir pólýetýlenglýkól 400. Þeir hlutar af hundraðshluta lífniðurbrots sem fengust úr mælingum á uppleystu ólífrænu kolefni (DIC) voru frekar lágir en breytilegir. Fyrir palmitínsýru spannaði það bilið 0–35%, meðaltal 12%, frávíksstuðull 92% og fyrir pólýetýlenglýkól 400 0–40%, meðaltal 24% og frávíksstuðull 54%.

LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Búnaður

13. Gerð er krafá um venjulegan búnað fyrir rannsóknarstofur og eftirfarandi:

- a) ræktunarkassi — neistalaus og með nákvæmni 35 °C ± 2 °C,
- b) þrýstipólín prófunarilát úr gleri af víðeigandi nafnstærð (¹⁶), hvert um sig með gasþéttri himnu sem getur þolað álag sem nemur u.þ.b. 2 börum. Kollrúmsrúmmál skal vera u.þ.b. 10% til 30% af heildarrúmmáli. Ef lífgas er losað reglulega ætti rúmmál kollrúms að vera u.þ.b. 10% en ef gaslosunin fer eingöngu fram við lok prófunarinnar ætti það að vera 30%. Mælt er með glersemmiflökum með nafnrúmmálið 125 ml, u.þ.b. 160 ml raunrúmmál, lokaðar með sermihimnu (¹⁷) og krumpuðum álh-ring (e. *crimped aluminium ring*) ef þrýstingur er losaður við sérhvern sýnatökutíma,
- c) Mælibúnaður til að mæla þrýsting (¹⁸) sem er aðlagður þannig að hann geti mælt og loftað gas sem myndast, t.d. nákvæmnisþrýstmælir, sem haldið er á, tengdur við víðeigandi sprautunál; þríátta gasþéttur loki auðveldar losun umframþrýstings (1. viðbætur). Nauðsynlegt er að halda innra rúmmáli þrýstiskynjaraleiðslanna og lokanna eins litlu og unnt er til þess að skekkjur, sem leiða af því að ekki er fylgst nógu vel með rúmmáli búnaðarins, séu óverulegar,

⁽¹⁶⁾ Ráðlögð stærð er 0,1 til 1 lítri.

⁽¹⁷⁾ Mælt er með því að nota gasþétta sílikonhimnu. Enn fremur er mælt með því að gasþéttni loka, einkum himna úr bütýlgúmmíi, sé prófuð því nokkuð margar himnur, sem fást á almennum markaði, eru ekki nægilega gasþéttar m.t.t. metans og sumar himnur haldast ekki þéttar þegar stungið er í þær með nál við þessi prófunarskilyrði.

⁽¹⁸⁾ Tækið skal nota og kvarða með reglulegu millibili samkvæmt leiðbeiningum framleiðandans. Ef notaður er þrýstingsmælir af tilskildum gæðum, t.d. í hylki úr stálhimnu, er kvörðun í rannsóknarstofunni ekki nauðsynleg. Hægt er að prófa nákvæmni kvörðunarinnar á rannsóknarstofu með eins punkts mælingu við 1 × 105 Pa samanborið við þrýstingsmæli með vélrænni skífu. Ef þessi punktur er mældur rétt helst línuleikinn einnig óbreyttur. Ef annar mælingarbúnaður er notaður (án kvörðunar sem er vottuð af framleiðanda) er mælt með kvörðun á öllu styrkbilinu með reglulegu millibili.

Athugasemd — Þrýstingsmælingarnar eru notaðar beint til að reikna magn kolefnis sem myndast í kollrúminu (42. til 44. liður). Að öðrum kosti er hægt að breyta þrýstingsálestrinum yfir í rúmmál gass (við loftþrýsting við 35 °C) sem myndast með því að nota umreikningslínurit. Þetta línurit er byggt á þeim skráðu mælingagögnum fyrir stöðgaðan þrýsting sem fást þegar þekktu magni köfnunarefnisgass er sprautað í röð prófunariláta (t.d. sermiflöskur) við 35° +/- 2 °C (sjá 2. viðbæti). Útreikningurinn er sýndur í athugasemd við 44. lið.

Viðvörðun — gætið þess að forðast stunguáverka ef notaðar eru mikrósprautur.

- d) kolefnisgreiningatæki sem hentar við beina ákvörðun á ólífrænu kolefni á bilinu 1 mg/l til 200 mg/l,
- e) mjög nákvæmar sprautur fyrir gaskennd sýni og fljótandi sýni,
- f) segulhræribúnaður og hræriseglar (valkvætt),
- g) Hanskakassi (mælt með).

Prófefni

14. Nota skal prófefni af greiningarhreinleika allan tímann.

Vatn

15. Eimað eða afjónað vatn (afildað með loftbóluhreinsun með köfnunarefnisgasi sem inniheldur innan við 5 µl/l af súrefni) sem inniheldur innan við 2 mg/l af uppleystu, lífrænu kolefni (DOC).

Prófunarmiðill

16. Tilreiða skal þynningarmiðilinn þannig að hann innihaldi eftirfarandi efnisþætti í tilgreindu magni,

Vatnsfrítt kalíumtvívetnisfosfat (K ₂ HPO ₄)	0,27 g
Tólfvatnað dínatríumvetnisfosfat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	1,12 g
Ammóníumklóríð (NH ₄ Cl)	0,53 g
Kalsíumklóríðdihýdrat (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0,075 g
Magnesiumklóríðhexahýdrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	0,10 g
Járn(II)klóríðtetrahýdrat (FeCl ₂ ·4H ₂ O)	0,02 g
Resasúrín (súrefnisvísir)	0,001 g
Natríumsúlfíðnónahýdrat (Na ₂ S·9H ₂ O)	0,10 g
Stofnlausn með snefilefnum (valkvætt, 18. liður)	10 ml
Afilduðu vatni er bætt við (15. liður)	að 1 lítra

Athugasemd: Nota skal nýfengið natríumsúlfíð eða það þvegið og þurrkað fyrir notkun til að tryggja að það hafi nægilega afoxunargetu. Framkvæma má prófunina án þess að nota hanskakassa (sjá 26. lið). Í því tilviki ætti að auka endanlegan styrk natríumsúlfíðs í miðlinum upp í 0,20 g af Na₂S · 9H₂O fyrir hvern lítra. Einnig er hægt að bæta við natríumsúlfíði úr viðeigandi loftfirtri stofnlausn gegnum himnuna á lokuðu prófunarilátunum, þar eð þessi aðferð dregur úr áhættu á oxun. Í stað natríumsúlfíðs má nota títan(III)sítrat sem er bætt við í gegnum himnu lokaðra prófunariláta í lokastyrknum 0,8 til 1,0 mmól/l. Títan(III)sítrat er mjög öflugt afoxunarefni með litil eiturhrif og er tilreitt eins og hér segir: Leyst eru upp 2,94 g af þrínatríumsítratdihýdrati í 50 ml af afilduðu vatni (sem verður

að 200 mmól/l lausn) og 5 ml af 15% (massi miðað við rúmmál) títan (III) klóríðlausn bætt við. Hlutleyst í pH-gildið $7 \pm 0,2$ með ólífrænum basa og deilt í viðeigandi ílát við köfnunarefnisflæði. Styrkur títan(III)sítrats í þessari stofnlausn er 164 mmól/l.

17. Efnisþáttum prófunarmiðilsins er blandað saman, nema afoxunarefninu (natríumsúlfítítansítrat) og lausnin loftbólureinsuð með köfnunarefnisgasi í u.þ.b. 20 mín. rétt fyrir notkun til að fjarlægja súrefni. Síðan er bætt við viðeigandi magni af nýlagðri lausn með afoxunarefninu (lögðuð í afilduðu vatni) rétt áður en miðillinn er notaður. Sýrustig miðilsins er stillt, ef þörf krefur, með þynntri ólífrænni sýru eða basa þannig að það verði $7 \pm 0,2$.

Stofnlausn með snefilefnum (valkvætt)

18. Mælt er með því að prófunarmiðillinn innihaldi eftirfarandi snefilefni til að bæta niðurbrotsferli við loftfirrðar aðstæður, einkum ef notaðir eru lágir sáðstyrkleikar (t.d. 1g/l) (11. heimild).

Mangan(II)klóríðtetrahýdrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Bórsýra (H_3BO_3)	5 mg
Sinkklóríð ($ZnCl_2$)	5 mg
Kopar(II)klóríð ($CuCl_2$)	3 mg
Dínatríummólybdatdihýdrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Kóbaltklóríðhexahýdrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Nikkel(II)klóríðhexahýdrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Dínatríumselenít (Na_2SeO_3)	5 mg
Afilduðu vatni er bætt við (15. liður)	að 1 lítra

Prófunarefni

19. Prófunarefninu er bætt við sem stofnlausn, sviflausn, ýrulausn eða beint sem föstu eða fljótandi efni eða ísogað á glertrefjasíu til að fá styrkleika sem nemur ekki meira en 100 mg/l af lífrænu kolefni. Ef notaðar eru stofnlausnir skal tilreiða hæfilega lausn með vatni (15. liður) (áður afilduð með loftbólureinsun með köfnunarefnisgasi) með þeim styrkleika að viðbætt magn sé innan við 5% af heildarrúmmáli hvarfblöndunnar. Stilla skal pH-gildi stofnlausnanna í $7 \pm 0,2$ ef nauðsynlegt er. Að því er varðar prófunarefni sem eru ekki nægilega vatnsleysanleg sjá ISO 10 10634 (13. heimild). Ef notaður er leysir skal tilreiða viðbótarsamanburð þar sem leysinum er einungis bætt við ísáða miðilinn. Forðast skal að nota lífræna leysa sem vitað er að hamli metanmyndun, s.s. klóróform og koltetraklóríð.

Viðvörðun — meðhöndla skal eitruð prófunarefni með varúð og efni með óþekkta eiginleika.

Viðmiðunarefni

20. Viðmiðunarefni, s.s. natríumbensóat, fenól og pólýetýlenglykól 400, hafa verið notuð með góðum árangri til að fylgjast með ferlinu þar sem lífniðurbrot þeirra nemur meira en 60% á innan við 60 dögum. Tilreiða skal stofnlausn (í afilduðu vatni) með valda viðmiðunarefninu á sama hátt og prófunarefnið var tilreitt og pH-gildi hennar stillt í $7 \pm 0,2$, ef þörf krefur.

Samanburður með hömlun (skilyrði)

21. Í því skyni að fá upplýsingar um eitruð prófunarefnisins á loftfælnar örverur til að finna þann styrkleika sem best á við skal bæta prófunarefninu og viðmiðunarefninu í ílát með prófunarmiðlinum (sjá 16. lið) og hvort um sig skal vera með sama styrkleika og bætt er við í prófuninni (sjá 19. og 20. lið og sjá einnig ISO 13641-1, 12. heimild).

Seyra sem er brotin niður

22. Niðurbrotinni seyru er safnað úr niðurbrotstanki í skólphreinsistöð sem meðhöndlar aðallega heimilisskólþ. Fullkomin lýsing skal vera til á seyrunni og tilgreina skal bakgrunnsupplýsingar um hana (sjá 54. lið). Niðurbrotsseyra frá iðnaðarskólphreinsistöð er athugandi ef ætlunin er að nota aðlagð sáð. Notaðar eru flöskur með víðum hálsi úr eðlisþungu pólýetýleni eða svipuðu efni, sem getur þanist út, til að safna niðurbrotsseyrunni. Seyru er bætt í flöskurnar upp að u.þ.b. 1 cm frá toppi þeirra og þeim lokað tryggilega, helst með öryggisloka. Eftir að seyran, sem safnað var, hefur verið flutt á rannsóknarstofuna má nota hana beint eða setja hana í niðurbrotstank af rannsóknarstofustærð. Losa skal umframlífgas með því að opna seyruflöskurnar varlega. Einnig er hægt að nota loftirraða seyru, sem er ræktuð á rannsóknarstofu, sem sáðgjafa en virknistig hennar gæti hafa veikst.

Aðvörðun — Niðurbrotin seyra myndar eldfim gös sem skapa eld- og sprengihættu: hún inniheldur einnig lífverur sem geta verið sjúkdómsvaldandi og því skal viðhafa viðeigandi varúðarráðstafanir við meðhöndlun seyru. Af öryggisástæðum skal ekki nota glerlát til að safna seyru.

23. Til að draga úr bakgrunnsmyndun gass og minnka áhrif af samanburðarblönkum má íhuga forniðurbrot seyrunnar. Ef forniðurbrot er nauðsynlegt skal leyfa seyrunni að brotna niður án íblöndunar næringarefna eða efnaumhverfis við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ í allt að 7 daga. Komið hefur í ljós að forniðurbrot í u.þ.b. 5 daga hefur að jafnaði í för með sér ákjósanlegustu minnkun á gasmyndun í blanksýninu án þess að óviðunandi aukning verði á annaðhvort bið- eða ræktunartímabilum meðan á prófunarfasanum stendur eða að virkniskerðing verði að því er varðar lítinn fjölda efna sem prófuð eru.
24. Að því er varðar prófunarefni sem eru, eða vænst er að séu, torlífniðurbrotanleg, skal tekið til athugunar að láta seyruna verða fyrir váhrifum af prófunarefninu áður til að fá sáð sem er betur aðlagð. Í því tilviki skal bæta prófunarefninu, með styrk lífræns kolefnis upp á 5 mg/l til 20 mg/l, við niðurbrotsseyruna og rækta í allt að 2 vikur. Seyran sem hefur orðið fyrir fyrri váhrifum er þvegin vandlega fyrir notkun (sjá 25. lið) og skilyrðin við þau váhrif tilgreind í prófunarskýrslunni.

Sáð

25. Seyran er þvegin (sjá 22. til 24. lið) rétt fyrir notkun til að minnka styrk ólífræns kolefnis þannig að hann verði innan við 10 mg/l í endanlegu prófunarsviflausninni. Seyran er skilin í skilvindu í lokuðum tilraunaglösnum (t.d. 3000 g í 5 mín.) og flötinu fleygt. Köggullinn sem myndast er leystur upp í afilduðum miðli (16. og 17. liður), lausnin er skilin aftur og flötinu fleygt. Ef magn ólífræns kolefnis hefur ekki minnkað nægilega mikið er hægt að endurtaka ferlið við þvott seyrunnar tvisvar að hámarki. Það virðist ekki hafa neikvæð áhrif á örverurnar. Að lokum er köggullinn leystur upp í tilskildu rúmmáli prófunarmiðilsins og styrkur fastra efna í heild sinni ákvarðaður [t.d. ISO 11923 (15. heimild)]. Lokastyrkur fastra efna í heild sinni í prófunarlátunum skal vera á bilinu 1 g/l til 3 g/l (eða um 10% þess sem það er í óþynntri niðurbrotinni seyru). Haga skal aðgerðunum að ofan þannig að seyran komist í sem minnsta snertingu við súrefni (t.d. með því að nota köfnunarefnisandrúmsloft).

PRÓFUNARADFERÐ

26. Eftirfarandi upphafsverkferli er fylgt með því að nota tækni sem heldur snertingu milli niðurbrotinnar seyru og súrefnis í eins miklu lágmarki og mögulegt er, t.d. getur verið nauðsynlegt að vinna í hanskakassa í köfnunarefnisandrúmslofti og/eða hreinsa flöskurnar með köfnunarefni (4. heimild).

Undirbúningur prófunar- og samanburðargreininga

27. Tekin eru a.m.k. til þrjú prófunarlát (sjá 13. lið b) undir prófunarefni, samanburðarblanka, viðmiðunarefni, samanburð með hömlun (skilyrði) og þrýstingsstýrð hól (valfrjáls aðferð) (sjá 7. og 19. til 21. lið). Einnig má taka til viðbótarlát sem ætluð eru til að áætla frumlífníðurbrot með því að nota sérþækar prófunarefnagreiningar. Hægt er að nota sama sett samanburðarblanka fyrir nokkur prófunarefni í sömu prófun svo fremi sem rúmmál kollrúms

- haldast jöfn.
28. Þynnta sáðið er tilreitt áður en því er bætt í ílátin, t.d. með pípettu með stóru opi. Deiliskömmtum af vel blönduðu sáði (25. liður) er bætt við til að heildarstyrkur fastra efna í heild sinni sé hinn sami í öllum ílátunum (milli 1 g/l og 3 g/l). Stofnlausnum prófunar- og viðmiðunarefnanna er bætt við eftir að pH-gildið hefur verið stillt í $7 \pm 0,2$, ef þörf er á. Prófunar- og viðmiðunarefninu skal bætt við með því að nota heppilegustu íbætingarleiðina (19. liður).
29. Prófunarstyrkur lífræns kolefnis skal að jafnaði vera milli 20 og 100 mg/l (4. liður). Ef prófunarefnið er eitrad skal minnka prófunarstyrkinn niður í 20 mg C/l, jafnvel minna ef einungis er ætlunin að mæla frumlífniðurbrot með sértækum greiningum. Athuga skal að breytileiki prófunarmiðurstaðna eykst við lægri prófunarstyrk.
30. Í ílátin með blanksýnunum er bætt samsvarandi magni af burðarefninu sem notað er til skammta prófunarefnið í stað stofnlausnar, sviflausnar eða ýrulausnar. Ef prófunarefninu er bætt við með trefjaglerssíum eða lífrænum leysum er bætt við blanksýnin síu eða samsvarandi magni af leysi sem hefur verið látinn gufa upp. Tilreiða skal aukalega samhliða prófun með prófunarefni til að mæla pH-gildið. Ef nauðsyn krefur skal stilla pH-gildið í $7 \pm 0,2$ með litlu magni þynntrar ólífrænnar sýru eða basa. Bæta skal sama magni efna til hlutleysingar í öll prófunarílátin. Ekki ætti að vera þörf á þessum viðbótum þar sem sýrugildi stofnlausna af prófunarefninu og viðmiðunarefninu hafa þegar verið stillt (sjá 19. og 20. lið). Ef mæla skal frumlífniðurbrot skal taka viðeigandi sýni úr samanburðarílátinu fyrir sýrustig, eða úr viðbótarprófunarílátinu, og mæla skal styrkleika prófunarefnisins með sértækum greiningum. Bæta má húðuðum seglum við öll ílátin ef hræra á í hvarfblöndum (valfrjálst).
31. Tryggja verður að heildarrúmmál vökva, V_1 , og rúmmál kollrúms, V_h , sé hið sama í öllum ílátum; gildi V_1 og V_h skulu athuguð og skráð. Öllum ílátum skal lokað með gashimnu og þau færð úr hanskakassanum (sjá 26. lið) yfir í ræktunarkassann (sjá 13. lið a).

Óleysanleg prófunarefni

32. Vegnu magni efna, sem eru torleysanleg í vatni, er bætt beint við í tilreidd ílátin. Ef nauðsynlegt er að nota leysi (sjá 19. lið) skal færa prófunarefnislausnina eða sviflausnina, yfir í tömu ílátin. Leysirinn er látinn gufa upp, ef hægt er, með því að leiða köfnunarefnisgas í gegnum ílátin og bæta svo við hinum innihaldsefnunum, þ.e.a.s. þynntri seyru (25. liður) og afilduðu vatni, eftir þörfum. Einnig skal tilreiða viðbótarsamanburð með leysi (sjá 19. lið). Hægt er að fletta upp í ISO 10634 (13. heimild) að því er varðar aðrar aðferðir við íbót óleysanlegra efna. Skammta má fljótandi prófunarefni með sprautu í fullkomlega tilreidd, lokað ílát ef þess er vænst að upphafsgildi pH fari ekki yfir 7 ± 1 , skammtið annars eins og lýst er að framan (sjá 19. lið).

Ræktun og mælingar á gasþrýstingi

33. Tilreiddu ílátin eru sett í ræktun við $35 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ í u.þ.b. 1 klst. til að ná jafnvægi og umframgas losað út í andrúmsloftið, t.d. með því að hrista ílátin hvert á fætur öðru, stinga nálinni á þrýstingsmælinum (13. liður c) í gegnum lokið og opna lokann þar til þrýstingsmælirinn sýnir núll. Ef kollrúmsþrýstingur er lægri en loftþrýstingur á þessu stigi, eða þegar gerðar eru millimælingar, skal bæta við köfnunarefnisgasi til að koma aftur á loftþrýstingi. Lokanum er lokað (sjá 13. lið c) og ræktun haldið áfram í myrkri og tryggt að allir hlutar ílátanna haldist við niðurbrotshitastig. Fylgst er með ílátunum eftir ræktun í 24 til 48 klst. Hafna skal ílátum ef greinilegur bleikur litur kemur fram á flotinu í innihaldi ílátanna, þ.e. ef resasúrín (sjá 16. lið) hefur breytt um lit og gefur vísbendingu um tilvist súrefnis (sjá 50. lið). Þótt kerfið kunni að þola lítið magn súrefnis getur hærri styrkleiki alvarlega hamlað ferli loftfirrs lífniðurbrots. Ásættalegt er að hafna einstöku ílátinu í þrýsnasetti við og við en ef fleiri mistök en svo verða

- er nauðsynlegt að fram fari rannsókn á tilraunaferlunum og einnig þarf að endurtaka prófunina.
34. Blandið vandlega saman innihaldi sérhvers íláts með því að hræra í því eða hrista það í nokkrar mínútur a.m.k. 2. eða 3. sinnum í viku og skömmu fyrir hverja þrýstingsmælingu. Hristingur þyrlar aftur upp sáðinu og tryggir gasjafnvægi. Allar þrýstingsmælingar skal gera hratt vegna þess að hitastig gæti lækkað í prófunarílátunum og það leiðir til rangra mælinga. Þegar mæling á þrýstingi er gerð skal halda öllu prófunarílátinu, þ.m.t. kollrúmi, við niðurbrotshitastigið. Mælið gasþrýstinginn, t.d. með því að stinga sprautunálinni í gegnum himnuna (13. liður c) sem tengist mælinum sem vaktar þrýstinginn. Hafa skal gát á og koma í veg fyrir að vatn komist í sprautunálina og ef slíkt kemur fyrir verður að þurrka blautu hlutana og setja upp nýja nál. Þrýstingur er mældur í millibörum (sjá 42. lið). Þrýstinginn í ílátunum má mæla reglulega, t.d. vikulega, og valfrjálst er að losa umframgas út í andrúmsloftið. Annar kostur er að mæla þrýstinginn einungis við lok prófunarinnar til að ákvarða magn lífgass sem myndast hefur.
35. Mælt er með því að gera millimælingar á gasþrýstingi þar sem aukning á þrýstingi er leiðbeinandi um það hvenær ljúka má prófuninni og gerir kleift að fylgjast með hvarfafræðinni (sjá 6. lið).
36. Að jafnaði skal ljúka prófuninni eftir 60 daga ræktunartímabil nema ferill lífniðurbrotsins, fenginn út frá þrýstingsmælingunum, hafi áður náð jafnvægisfasa, þ.e.a.s. þeim fasa þar sem hámarksniðurbroti hefur verið náð og lífniðurbrotsferillinn hefur jafnast út. Ef jafnvægisgildið er innan við 60% er túlkun örðugleikum bundin vegna þess að það gefur til kynna að einungis hluti sameindarinnar hafi brotnað niður eða að mistök hafi verið gerð. Ef gas myndast við lok eðlilegs ræktunartímabils en jafnvægisfasa hefur augljóslega ekki enn verið náð skal íhuga að lengja prófunina til að athuga hvort jafnvægi (> 60%) verður náð.

Mæling ólífræns kolefnis

37. Við lok prófunarinnar, eftir síðustu mælingu á gasþrýstingi, er seyrinni leyft að setjast. Opna skal hvert ílátið af öðru og taka strax sýni til ákvörðunar á styrkleika (mg/l) ólífræns kolefnis í flötinu. Hvorki skal nota skiljun né siun við flötið þar sem þá yrði óviðunandi tap á uppleystum koltvísýringi. Ef ekki er unnt að greina vökvann við sýnatökuna er hann settur til geymslu í lokuðu mælingaglassi án kollrúms og kældur niður í u.þ.b. 4 °C í allt að 2 daga. Að lokinni mælingu á ólífrænu kolefni er sýrustigið mælt og skráð.
38. Einnig er hægt að ákvarða óbeint styrk ólífræns kolefnis í flötinu samkvæmt koltvísýringslosuninni sem er mælanleg í kollrúminu. Stillið þrýstinginn að loftþrýstingi í sérhverju prófunaríláti að lokinni síðustu mælingu á gasþrýstingi. Sýra skal innihald sérhvers íláts að u.þ.b. pH-gildinu 1 með því að bæta við óblandaðri ólífrænni sýru (t.d. H₂SO₄) í gegnum himnuna á lokuðum ílátunum. Ílátin, sem hrist hafa verið, eru ræktuð við 35 °C ± 2 °C í u.þ.b. 24 klst. og gasþrýstingurinn vegna koltvísýringsmyndunarinnar mældur með þrýstingsmælinum.
39. Sambærilegar mælingar eru gerðar á samsvarandi blanksýni, viðmiðunarefni og samanburðarílátum með hömlun, ef þau eru höfð með (sjá 21. lið).
40. Í sumum tilvikum er rétt að gera mælingar á millistyrkleikum ólífræns kolefnis í prófunar- og samanburðarílátum eftir því sem þörf er á, einkum ef sömu samanburðarílát eru notuð fyrir nokkur prófunarefni. Í slíku tilviki skal tilreiða nægilegan fjölda íláta fyrir allar millimælingar. Þessi aðferð er æskilegri en að taka sýnin úr einungis einu íláti. Hið síðara er einungis hægt ef það magn sem þarf fyrir greiningu á uppleystu ólífrænu kolefni er ekki talið vera of mikið. Mæling á uppleystu ólífrænu kolefni skal gerð eftir að gasþrýstingur hefur verið mældur án losunar umframgass, eins og lýst er hér að neðan:
- flotsýni, með eins litlu rúmmáli og mögulegt er, eru tekin með sprautu í gegnum himnuna án þess að opna ílátin og ólífrænt kolefni í sýninu er ákvarðað,

- að lokinni töku sýnanna er umframgas losað eða ekki,
- taka skal tillit til þess að jafnvel lítil minnkun á rúmmáli flotsins (t.d. um 1%) getur stórukið rúmmál gass í kollrúminu (V_h),
- jöfnurnar (sjá 44. lið) eru leiðréttar með því að stækka V_h í jöfnu 3 eftir því sem þörf er á.

Sértækar greiningar

41. Ef ákvarða skal frumlífniðurbrot (sjá 30. lið) er viðeigandi magn sýnis tekið til sértækra greininga úr ílátum með prófunarefninu í upphafi og við lok prófunarinnar. Sé slíkt gert skal athuga að rúmmál kollrúms (V_h) og vökva (V_l) hefur breyst og taka þarf tillit til þessa við útreikning á niðurstöðum gasmyndunar. Önnur leið er að taka sýni til sértækra greininga úr viðbótarblöndum sem áður hafa verið tilreiddar í þessum tilgangi (sjá 32. lið).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

42. Af hagkvæmnisástæðum er gasþrýstingur mældur í millibörum (1 mbar = 1h Pa = 10² Pa; 1 Pa = 1 N/m²), magn í lítrum og hitastig í gráðum á selsíus.

Kolefni í kollrúmi

43. Þar sem 1 mól af metani og 1 mól af koltvísýringi inniheldur 12 g af kolefni, hvort um sig, er hægt að gefa massa kolefnis í tilteknu magni myndaðs gass upp sem:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad 1. \text{ jafna}$$

þar sem:

- m = massi kolefnis (mg) í tilteknu magni gass sem myndast,
- 12 = hlutfallslegur atómmassi kolefnis,
- n = fjöldi gasmóla í tilteknu magni.

Ef annað gas en metan eða koltvísýringur (t.d. N₂O) myndast í umtalsverðu magni skal breyta formúlu [1] þannig að hún lýsi möguleikanum á áhrifum af gösum sem myndast.

44. Út frá gaslögmálunum er hægt er að setja n fram sem

$$n = \frac{pV}{RT} \quad 2. \text{ jafna}$$

þar sem:

- p = gasþrýstingur (Pasköl),
- V = rúmmál gassins (m³),
- R = mólgasfasti [8,314 J/(mól K)],
- T = ræktunarhitastig (kelvin).

Með samtengingu 1. og 2. jöfnu og aðlögun sem gerir ráð fyrir gasmyndun í samanburðarblanksýninu:

$$m_h \frac{12000 \times 0,1 (\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad 3. \text{ jafna}$$

þar sem:

- m_h = massi nettókolefnis sem myndast sem gas í kollrúminu (mg),
- Δp = meðaltal mismunarins milli upphafs- og lokaþrýstings í prófunarílátum að frádregnu samsvarandi meðaltali í ílátum með blanksýnum (millibör),
- V_h = rúmmál kollrúms í ílátinu (l),

0,1 = umreikningur fyrir bæði nýuton/m² yfir í millibör og m³ yfir í lítra.

Nota skal 4. jöfnu fyrir hefðbundið ræktunarhitastig við 35 °C (308 K):

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad 4. \text{ jafna}$$

Athugasemd: Annar rúmmálsútreikningur Mælisálestur vegna þrýstings er umreiknaður í ml af mynduðu gasi með því að nota staðalferilinn sem fæst með því að teikna upp rúmmál (ml) sem sprautað er inn á móti mælisálestri (2. viðbætur). Fjöldi móla (n) af gasi í kollrúmi í sérhverju íláti er reiknaður með því að deila uppsafnaðri gasmyndun (ml) með 25286 ml/mól sem er það rúmmál sem eitt mól af gasi fyllir við 35 °C og staðlaðan loftþrýsting. Þar sem 1 mól af metani og 1 mól af koltvísýringi inniheldur hvort um sig 12 g af kolefni er kolefnismagn (mg) í kollrúmi (m_h) sýnt í 5. jöfnu:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad 5. \text{ jafna}$$

Aðlögun til að gera ráð fyrir gasmyndun í samanburðarblanksýni:

$$m_h = \frac{12000 \times \Delta V}{25286} = 0,475 \Delta v \quad 6. \text{ jafna}$$

þar sem:

m_h = massi nettókolefnis sem myndast sem gas í kollrúminu (mg),

ΔV = meðaltal mismunarins á mynduðu gasmagni í kollrúmi í prófunarílátunum og ílátunum með samanburðarblanki,

25286 = rúmmál sem 1 gasmól fyllir við 35 °C, 1 loftþyngd.

45. Fylgjast má með ferli lífniðurbrotsins með því að teikna upp uppsafnaða þrýstingsaukningu Δp (millibör) á móti tíma, ef við á. Út frá þessum ferli er biðfasi fundinn og skráður (dagar). Biðfasi er tíminn frá því að prófun hefst þar til umtalsvert niðurbrot hefst (sjá dæmi í 3. viðbæti). Ef tekin voru millibilssýni af flotinu og þau greind (sjá 40., 46. og 47. lið) er hægt að teikna upp heildarmyndun kolefnis (bæði í gasi og vökva) í stað uppsafnaðs þrýstings eingöngu.

Kolefni í vökvanum

46. Lítið er fram hjá metanmagni í vökvanum vegna þess að þekkt er að vatnsleysni þess er mjög lítil. Massi ólífræns kolefnis í vökvanum í prófunarílátinu er reiknaður með því að nota 7. jöfnu:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad 7. \text{ jafna}$$

þar sem:

m_l = massi ólífræns kolefnis í vökvanum (mg),

C_{net} = styrkur ólífræns kolefnis í prófunarílátinu að frádregnum styrknum í samanburðarílátunum við lok prófunarinnar (mg/l),

V_l = rúmmál vökva í ílátinu (l).

Heildarmagn kolefnis í gasformi

47. Heildarmassi kolefnis í gasformi í ílátinu er reiknaður með því að nota 8. jöfnu:

$$m_t = m_h + m_l \quad 8. \text{ jafna}$$

þar sem:

m_t = heildarmassi kolefnis í gasformi (mg),

m_h og m_v eru samkvæmt því sem skilgreint er að ofan.

Kolefni í prófunarefni

48. Massi þess kolefnis í prófunarílátunum sem leiðir af viðbætta prófunarefninu er reiknaður með því að nota 9. jöfnu:

$$m_v = C_c \times V_l \quad 9. \text{ jafna}$$

þar sem:

m_v = massi kolefnis í prófunarefni (mg),

C_c = styrkleiki kolefnis í prófunarefninu í prófunarílátinu (mg/l)

V_l = rúmmál vökva í prófunarílátinu (l).

Umfang lífníðurbrots

49. Hundradshluti lífníðurbrots vegna gass í kollrúmi er reiknaður með því að nota 10. jöfnu og heildarhundradshluti lífníðurbrots með því að nota 11. jöfnu:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad 10. \text{ jafna}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad 11. \text{ jafna}$$

þar sem:

D_h = lífníðurbrot vegna gass í kollrúmi (%),

D_t = heildarlífníðurbrot (%),

m_h , m_v and m_t eru samkvæmt því sem framfar er skilgreint.

Umfang frumlífníðurbrots er reiknað út frá (valfrjálsum) mælingum á styrk prófunarefnisins við upphaf og lok ræktunarinnar með því að nota 12. jöfnu:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \quad 12. \text{ jafna}$$

þar sem:

D_p = frumniðurbrot prófunarefnis (%),

S_i = upphafsstyrkur prófunarefnis (mg/l),

S_e = styrkur prófunarefnis í lokin (mg/l).

Ef greiningaraðferðin gefur til kynna marktæka styrkleika prófunarefnisins í óbreyttu loftfælnu seyrusáði skal nota 13. jöfnu:

$$D_p^l = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad 13. \text{ jafna}$$

þar sem:

D_p^l = leiðrétt frumniðurbrot prófunarefnis (%),

S_{ib} = „sýnilegur“ upphafsstyrkur prófunarefnis í samanburðarblöndum (mg/l),

S_{eb} = „sýnilegur“ lokastyrkur prófunarefnis í samanburðarblöndum í lokin (mg/l).

Réttmæti niðurstaðna

50. Eingöngu skal nota þrýstingsálestra úr ílátum sem ekki sýna bleikan lit (sjá 33. lið). Mengun frá súrefni er lágmerkud með því að nota viðeigandi loftfirrðar meðhöndlunaraðferðir.
51. Það skal metið svo að prófunin sé gild ef viðmiðunarefnið nær jafnvægi sem samsvarar meira en 60% lífníðurbroti (¹⁹).

(¹⁹) Þetta skal endumetið ef ásogandi og óleysanleg viðmiðunariðefni eru höfð með.

52. Ef pH-gildið við lok prófunarinnar hefur farið yfir bilið 7 ± 1 og lífniðurbrot hefur verið ófullnægjandi er prófunin endurtekin með aukinni jafnarmynd miðilsins.

Hömlun niðurbrots

53. Gasmyndun í ílátum, sem innihalda bæði prófunarefnið og viðmiðunarefni, skal vera a.m.k. jöfn þeirri sem er í ílátum sem einungis innihalda viðmiðunarefni, annað er vísbending um hömlun á gasmyndun. Í sumum tilvikum er gasmyndun í ílátum sem innihalda prófunarefni án viðmiðunarefnis minni en í samanburðarblankprófunum og gefur til kynna að prófunarefnið sé hamlandi.

Prófunarskýrsla

54. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

- almennt heiti, efnaheiti, CAS-númer, byggingarformúla og viðeigandi eðlisefnafræðilegir eiginleikar,
- hreinleiki (óhreinindi) prófunarefnis,

Prófunarskýrsluþætti:

- rúmmál þynnts niðurbrotsvökva (V_i) og kollrúms (V_n) í ílátinu,
- lýsing á prófunarílátinu, helstu einkenni á mælingu lífgass (t.d. tegund þrýstingsmælis) og á greiningartækinu fyrir ólífrænt kolefni,
- notkun prófunarefnis og viðmiðunarefnis í prófunarkerfinu, prófunarstyrkur sem er notaður og hvers kyns notkun leysa,
- upplýsingar um sáðið sem var notað: heiti skólphreinsistöðvarinnar, lýsing á uppruna skólpsins sem var meðhöndlað (t.d. hiti við vinnslu, viðstöðutími seyru, hvort skólp er aðallega frá heimilum, o.s.frv.), styrkur, allar upplýsingar sem nauðsynlegar eru til að staðfesta þetta og upplýsingar um hvers kyns formeðhöndlun sáðsins (t.d. forniðurbrot eða fyrri váhrif),
- ræktunarhiti,
- fjöldi samhliða prófana.

Niðurstöður:

- pH-gildi og gildi ólífræns kolefnis við lok prófunarinnar,
- styrkur prófunarefnisins við upphaf og lok prófunarinnar ef sérstök mæling hefur verið gerð,
- öll mæld gögn, sem safnað er við prófunina, blanksýni, viðmiðunarefni og samanburðarlát með hömlun, eftir því sem á, (t.d. þrýstingur í millibörum, styrkur ólífræns kolefnis (mg/l)) í töfluformi (mæld gögn um kollrúm og vökva skal setja fram aðskilið),
- tölfræðileg úrvinnsla gagna, lend prófunarinnar og skýringarmynd yfir lífniðurbrot prófunarefnisins, viðmiðunarefnisins og samanburðarins með hömlun,
- hundraðshluti lífniðurbrots prófunarefnis og viðmiðunarefnis,
- ástæður fyrir því að prófunarniðurstöðum er hafnað,
- umræða um niðurstöður.

HEIMILDIR

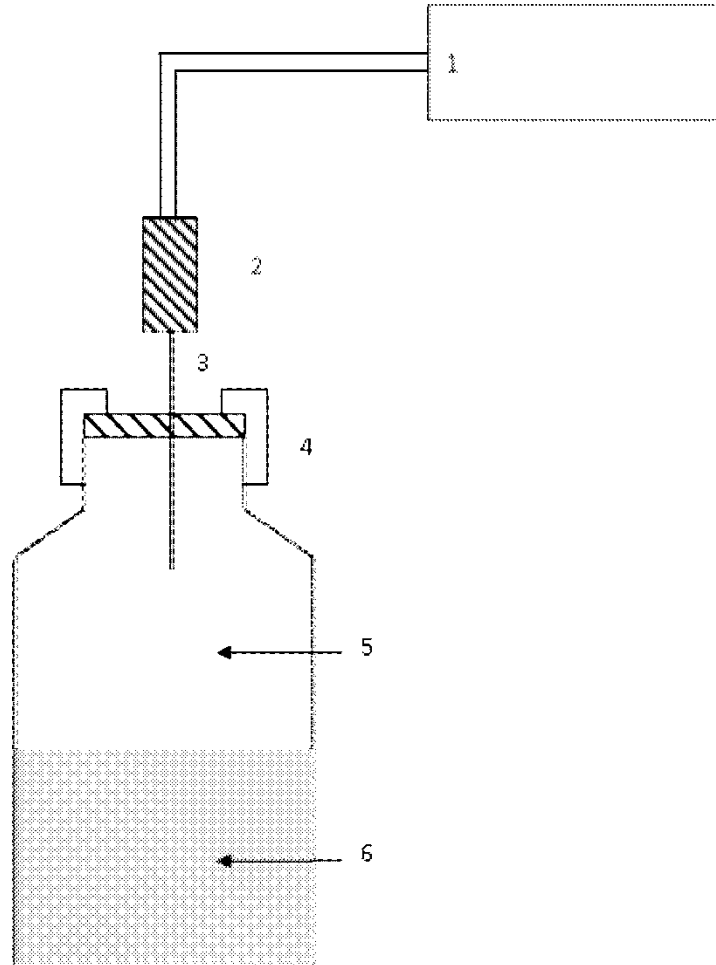
- 1) Eftirfarandi kaflar í þessum viðauka:

- C.4 Ákvörðun á auðlifbrjótanleika,
- C.9 Lífniðurbrot — Zahn-Wellens-prófun,
- C.10 Hermiprófun — loftháð skólphreinsun:
A: Einingar með virkri seyru, B: Örveruþekjur
- C.11 Lífniðurbrot — öndunarhömlun í virkri seyru

- 2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris
 - 3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).
 - 4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, 47, 850-857.
 - 5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
 - 6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 84-89.
 - 7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
 - 8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, 17, 2441-2460.
 - 9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.
 - 10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
 - 11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.
 - 12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.
 - 13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
 - 14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
 - 15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.
-

1. viðbætur

Dæmi um búnað til að mæla myndun lífgass með gasþrýstingi



Skýringar:

- 1 — Þrýstingsmælir
- 2 — Þrívirkur gasþéttur loki
- 3 — Sprautunál
- 4 — Gasþétt lok (krumpuð hetta (e. *crimped*) og himna)
- 5 — Kollrúm (V_g)
- 6 — Sáð úr niðurbrotinni seyru

Prófunarilát í umhverfi við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

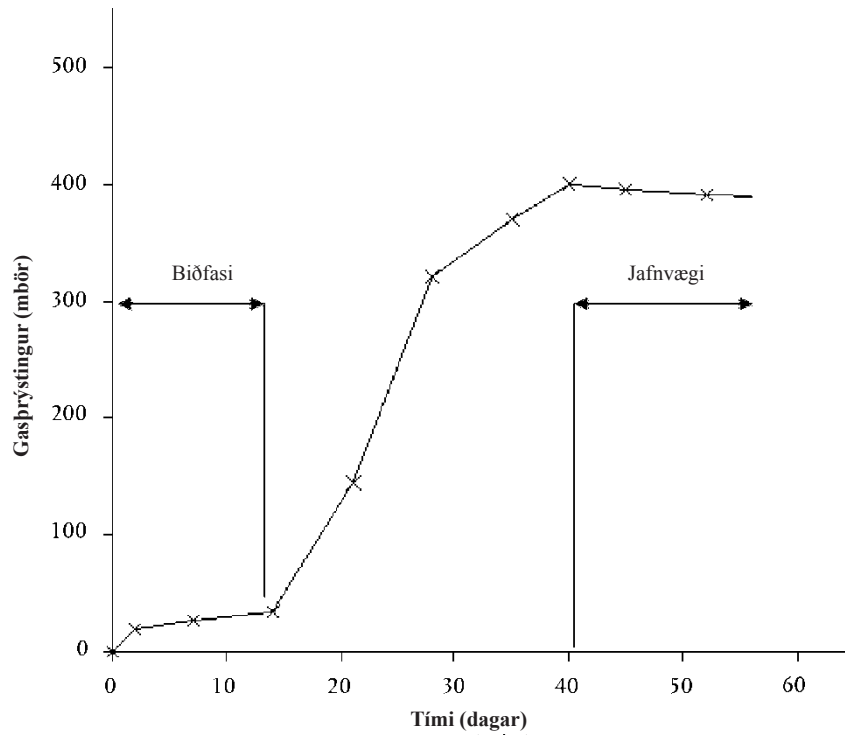
*2. viðbætur***Umreikningur vegna þrýstingsmælis**

Mælingarniðurstöður frá þrýstingsmælinum er hægt að tengja gasmagni með því að nota staðalferilinn sem kemur fram þegar dælt er inn þekktu loftmagni við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ í sermiflöskur sem innihalda vatnsmagn sem samsvarar magni hvarfblöndunnar, V_R :

- Deiliskammtar með V_R ml af vatni, sem er haldið við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, eru settir í fimm sermiflöskur. Flöskunum er lokað og þær settar í vatnsbað við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ í 1 klst til að jafnvægisstilla þær.
- Kveikt er á þrýstingsmælinum, hann látinn ná jafnvægi og stilltur á núll.
- Sprautunálinni er stungið gegnum lokið á einni flöskunni, lokinn opnaður og hafður opinn þar til þrýstingsmælirinn sýnir núll og þá er lokanum lokað.
- Aðferðin er endurtekin við flöskurnar sem eftir eru.
- Í hverja flösku er dælt 1 ml af lofti við $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Nálinni (á mælinum) er stungið gegnum lokið á einni flöskunni og þrýstingsaflesturinn látinn ná jafnvægi. Þrýstingurinn er skráður, lokinn opnaður og hafður opinn þangað til þrýstingsaflesturinn sýnir núll og þá er lokanum lokað.
- Aðferðin er endurtekin við flöskurnar sem eftir eru.
- Öll aðferðin að ofan er endurtekin og notaðir 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, og 50 ml af lofti.
- Umreikningsferillinn, þrýstingur (Pa) móti innsprautuðu gasrúmmáli V_b (ml), er teiknaður. Svörun tækisins er línuleg á bilinu 0 Pa til 70000 Pa, og 0 ml til 50 ml gasmyndunar.

3. viðbætur

Dæmi um niðurbrotsferil (uppsöfnuð nettóaukning á þrýstingi)



C.44 ÚTSKOLUN Í JARÐVEGSSÚLUM

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 312 um prófanir (2004). Tilbúin íðefni geta borist beint í jarðveginn með vísitandi beitingu (t.d. íðefni í landbúnaði) eða um óbeinar íkomuleiðir (t.d. um skólpu → skólpeðju → jarðveg eða loft → blauta/þurra ákomu). Við áhættumat á þessum íðefnum er mikilvægt að áætla getu þeirra til ummyndunar í jarðvegi og til hreyfingar (útskolunar) niður í dýpri jarðvegslög og að lokum í grunnvatn.
2. Nokkrar aðferðir eru tiltækar til að mæla útskolunargetu íðefna í jarðveg við stýrð skilyrði á rannsóknarstofu, þ.e. þunnlagsskiljun í jarðvegi, þykklagsskiljun í jarðvegi, jarðvegssúluskiljun og mælingar á ásogi/afsogi (1. og 2. heimild). Að því er varðar ójónuð íðefni þá gerir deilistuðull n-oktanóls og vatns (P_{ow}) kleift að meta snemma ásogs- og útskolunargetu þeirra (3.–5. heimild).
3. Prófunaraðferðin, sem hér er lýst, byggir á jarðvegssúluskiljun í hreyfðum jarðvegi (sjá skilgreiningu í 1. viðbæti). Tvær tegundir prófana eru framkvæmdar til að ákvarða i) útskolunargetu prófunariðefnisins og ii) útskolunargetu ummyndunarefna (rannsókn á eldri leifum) í jarðvegi við stýrð skilyrði á rannsóknarstofu⁽²⁰⁾. Þessi prófunaraðferð er byggð á fyrirliggjandi aðferðum (6.–11. heimild).
4. Á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (OECD) um val á jarðvegi eða seti, sem haldinn var í Belgíu á Ítalíu árið 1995 (12. heimild), var gerð samþykkt um það hvaða gerðir jarðvegs og hve margar skyldi nota í þessari prófunaraðferð. Þar voru einnig settar fram ráðleggingar varðandi töku, meðhöndlun og geymslu jarðvegssýna fyrir útskolunartilraunir.

MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

5. Súlnur úr hentugu hvarftregu efni (t.d. gleri, ryðfríu stáli, áli, tefloni, pólývínýlklóríði, o.s.frv.) eru fylltar með þjöppuðum jarðvegi, síðan mettaðar og jafnvægisstilltar með lausn úr „tilbúnu regni“ (sjá skilgreiningu í 1. viðbæti) og það látið hripa úr. Síðan er yfirborð hverjar jarðvegssúlu meðhöndlað með prófunariðefninu og/eða með eldri leifum prófunariðefnisins. Tilbúið regn er síðan notað á jarðvegssúlurnar og skolvökvanum safnað. Eftir útskolunarferlið er jarðvegurinn fjarlægður úr súlunum og honum skipt upp í viðeigandi fjölda hluta, eftir því hvaða upplýsingar þarf að fá út úr rannsókninni. Hver jarðvegshluti og skolvökvin er síðan greindur með tilliti til prófunariðefnisins og, ef við á, með tilliti til ummyndunarefna eða annarra efna sem eru til athugunar.

NOTKUNARSVIÐ PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

6. Þessi prófunaraðferð er notuð fyrir prófunariðefni (ómerkt eða geislamerkt: t.d. ^{14}C) þar sem fyrir liggja nógu nákvæmar og næmar greiningaraðferðir. Prófunaraðferðina skal ekki nota fyrir íðefni sem rjúka úr jarðvegi og vatni og haldast því ekki í jarðveginum og/eða skolvökvanum við tilraunaskilyrðin í þessari prófunaraðferð.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARIÐEFNIÐ

7. Hægt er að nota ómerkt eða geislamerkt prófunariðefni til að mæla útskolunarhegðun í jarðvegssúlum. Nota verður geislamerkt efni við rannsóknir á útskolun ummyndunarefna (eldri leifar prófunariðefnisins) og við ákvörðun á massajafnvægi. Mælt er með ^{14}C -merkingu en einnig getur verið gagnlegt að nota aðrar samsætur, t.d. ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Merкта efnið skal, svo sem framast er kostur, vera í stöðugasta hluta eða hlutum sameindarinnar. Hreinleiki prófunariðefnisins skal vera a.m.k. 95%.
8. Nota skal flest íðefni sem stök efni. Þegar um er að ræða virk efni í plöntuverndarvörum má þó nota samsettar vörur til að rannsaka útskolun móðurprófunarefnisins, en prófunar á þeim er einkum krafist þegar líklegt er að blandan hafi áhrif á losunarhraða (t.d. í kornuðum samsetningum eða samsetningum með stýrðri losun). Að því er varðar sértækar kröfur varðandi tilhögun prófunar fyrir blöndur getur verið gagnlegt að hafa samráð við eftirlitsyfyrvald áður en prófunin er framkvæmd. Móðurprófunarefnið skal notað í hreinu formi við rannsóknir á útskolun með eldri leifum.

⁽²⁰⁾ Rannsóknir á útskolun í súlu með plöntuvarnarefnum geta veitt upplýsingar um hreyfanleika prófunariðefnis og ummyndunarefni þess og geta komið til viðbótar við rannsóknir á sögi.

9. Áður en útskolunarprófun í jarðvegssúlum er gerð, er æskilegt að eftirfarandi upplýsingar um prófunarefnið liggi fyrir:
- 1) vatnsleysni [prófunaraðferð A.6] (13. heimild),
 - 2) leysni í lífrænum leysum,
 - 3) gufuþrýstingur [prófunaraðferð A.4] (13. heimild) og fasti samkvæmt lögmáli Henrys,
 - 4) deilistuðull n-oktanóls/vatns [prófunaraðferð A.8 og A.24] (13. heimild),
 - 5) ásogsstuðull (K_d , K_f eða K_{oc}) [prófunaraðferð C.18 og/eða C.19] (13. heimild),
 - 6) vatnsrof [prófunaraðferð C.7] (13. heimild),
 - 7) klofnunarstuðull (pK_a) [OECD-viðmiðunarregla um prófanir 112] (25. heimild),
 - 8) loftháð og loftfirrt ummyndun í jarðvegi [prófunaraðferð C.23] (13. heimild)

Athugasemd: Skrá skal í viðeigandi prófunarskýrslu við hvaða hitastig þessar mælingar eru gerðar.

10. Það magn prófunaríðefnis sem er sett í jarðvegssúlunnar skal vera nægilegt til að hægt sé að greina a.m.k. 0,5% af notuðum skammti í hverjum hluta fyrir sig. Að því er varðar virk íðefni í plöntuverndarvörum getur magn prófunaríðefnisins sem notað er samsvarað hámarks umfangi notkunar sem mælt er með (stök notkun).
11. Viðeigandi greiningaraðferð með þekktri nákvæmni, samkvæmni og næmi til að ákvarða magn prófunaríðefnisins og, ef við á, ummyndunarefna þess í jarðvegi og skolvökva skal vera fyrir hendi. Greiningarmörk fyrir prófunaríðefnið og mikilvæg ummyndunarefni þess (að jafnaði a.m.k. öll ummyndunarefni $\geq 10\%$ af skammtinum sem er notaður, sem koma fram í rannsóknnum á ummyndunarferli, en helst öll viðkomandi ummyndunarefni sem skipta máli) skulu einnig vera þekkt (sjá 17. lið).

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

12. Nota skal viðmiðunariðefni með þekktri útskolunarhegðun, s.s. atrasín eða mónúrón sem telst hafa miðlungs útskolun á því sviði, til að meta hlutfallslegan hreyfanleika prófunaríðefnisins í jarðveginum (1., 8. og 11. heimild). Einnig getur verið gagnlegt að nota skautað viðmiðunariðefni sem ásogast ekki og brotnar ekki niður (t.d. þrívetni, brómíð, flúrskinslausn, eósín) til að rekja hreyfingu vatns í súlnni, til að staðfesta straumfræðilega eiginleika jarðvegssúlunnar.
13. Stöðluð íðefni til greiningar geta einnig verið gagnleg við lýsingu á eiginleikum og/eða sanngreiningu á ummyndunarefnum sem finnast í jarðvegshlutum og í skolvökva með aðferðum þar sem litskilja eða litrófsgreinir eru notuð eða öðrum viðeigandi aðferðum.

SKILGREININGAR OG EININGAR

14. Sjá 1. viðbæti.

GÆDAVIÐMIÐANIR

Endurheimt

15. Endurheimt eftir útskolunarprófun jafngildir summu hundraðshluta prófunaríðefnisins sem finnst í jarðvegshlutunum og í skolvökvanum úr súlnni eftir útskolun. Endurheimt skal vera 90–110% fyrir geislamerkt íðefni (11. heimild) og 70–10% fyrir ómerkt íðefni (8. heimild).

Endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðar

16. Unnt er að kanna endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar við magngreiningu prófunaríðefnis og ummyndunarefna með tvöfaldrí greiningu á sama útdrætti á jarðvegshluta eða skolvökva (sjá 11. lið).

17. Greiningarmörk greiningaraðferðarinnar fyrir prófunariðefnið og fyrir ummyndunarefnið skulu vera a.m.k. 0,01 mg · kg⁻¹ í hverjum jarðvegshluta eða í skolvökva (sem prófunariðefni) eða 0,5% af skammtinum sem er notaður í hvern stakan hluta, hvort sem er minna af þessu tvennu. Magngreiningarmörk skulu einnig tilgreind.

LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Prófunarkerfi

18. Í prófunina skal nota útskolunarsúlur (sem hægt er að skipta upp í hluta eða ekki) úr hentugu hvarftregu efni (t.d. gleri, ryðfriur stáli, áli, tefloni, pólývínýlklóríði, o.s.frv.) með a.m.k. 4 cm innra þvermál og a.m.k. 35 cm á hæð. Prófa skal súluefnið með tilliti til hugsanlegra milliverkana við prófunariðefnið og/eða ummyndunarefni þess. Dæmi um hentugar súlur, sem hægt er að skipta upp í hluta eða ekki, eru sýnd í 2. viðbæti.
19. Til að fylla og þjappa jarðvegssúlurnar skal nota skeið, bullu og titringsbúnað.
20. Nota má bullu- eða slöngudælur, sturtuhausu, Mariotte-flöskur eða einfaldar dropatrektir við notkun á tilbúnu regni í jarðvegssúlurnar.

Rannsóknarstofubúnaður og íðefni

21. Nota þarf staðlaðan rannsóknarstofubúnað, einkum eftirfarandi:
- 1) greiningartæki, s.s. búnaður til gasvökvagreininga (GLC), háþrýstivökvaskiljunar (HPLC) og þunnlagsskiljunar (TLC), þ.m.t. viðeigandi greiningarkerfi til að greina merkt eða ómerkt íðefni eða aðferð með umsnúinni samsætubýningu,
 - 2) tæki til sanngreiningar (t.d. til massagreininga (MS), gas- og massagreininga (GC-MS), háþrýstivökvaskiljunar og massagreininga (HPLC-MS), segulómunar (NMR) o.s.frv.,
 - 3) vökvaindurteljari fyrir geislamerkt prófunariðefni,
 - 4) oxari til brennslu merkts efnis,
 - 5) útdráttarbúnaður (t.d. skilvinduglös fyrir kaldan útdrátt og Soxhlet-tæki fyrir samfelldan útdrátt við bakstreymi),
 - 6) tækjubúnaður til að þykkja lausnir og útdregna vökva (t.d. hverfieimir).
22. Meðal notaðra íðefna eru lífrænir leysar af greiningarhreinleika, s.s. aseton, metanól o.s.frv., sindurteljaravökvi, 0,01 M CaCl₂-lausn í eimuðu eða afjónuðu vatni (= tilbúið regn).

Prófunariðefni

23. Til að koma prófunariðefninu í jarðveginn skal leysa það upp í vatni (afjónuðu eða eimuðu). Ef prófunariðefnið er torleysanlegt í vatni má nota það annað hvort sem samsetta vöru (ef þörf krefur eftir að búið er að leysa upp eða ýra efnið) eða í lífrænum leysi. Ef lífrænn leysir er notaður skal nota sem minnst af honum og hann látinn gufa upp af yfirborði jarðvegssúlunnar áður en útskolunarferlið hefst. Fastar samsetningar, s.s. korn, skulu notaðar í föstu formi án vatns til að tryggja betri dreifingu á yfirborði jarðvegssúlunnar, samsettu vöruna má blanda með litlu magni af kvarssandi (t.d. 1 g) fyrir notkun.
24. Það magn prófunariðefnis sem er sett í jarðvegssúlurnar skal vera nægilegt til að hægt sé að greina a.m.k. 0,5% af notuðum skammti í hverjum hluta fyrir sig. Að því er varðar íðefni í plöntuverndarvörum getur magnið byggt á hámarks umfangi notkunar sem mælt er með (stök notkun) og skal, að því er varðar bæði móðurefni og eldri útskolun, tengjast yfirborðsfleti jarðvegssúlunnar sem notuð er ⁽²¹⁾.

⁽²¹⁾ Magnið sem skal setja í sívalar jarðvegssúlur er hægt að reikna út með eftirfarandi formúlu:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g}/\text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

þar sem:

M	=	magn notað í hverja súlu [μg]
A	=	notkunarmagn [kg · ha ⁻¹]
d	=	þvermál jarðvegssúlu [cm]
π	=	3,14

Viðmiðunariðefni

25. Nota skal viðmiðunariðefni í útskolunartilraununum (sjá 12. lið). Setja skal efnið á yfirborð jarðvegssúlunnar á svipaðan hátt og prófunariðefnið og í viðeigandi magni sem gerir viðeigandi greiningu mögulega, annað hvort sem innri staðal ásamt prófunariðefninu í sömu jarðvegssúlu eða eitt og sér í annarri jarðvegssúlu. Æskilegast er að prófa bæði íðefnin í sömu súlu, nema ef bæði íðefnin bera svipaða merkingu.

Jarðvegur

Val á jarðvegi

26. Í rannsóknunum á útskolun með móðurprófunariðefninu skal nota þrjár til fjórar jarðvegsgerðir með mismunandi sýrustigi, innihaldi lífræns kolefnis og kornastærð (12. heimild). Leiðbeiningar fyrir val á jarðvegi fyrir útskolunartilraunir eru í töflu 1. Þegar um er að ræða jónanleg prófunariðefni skal velja jarðvegsgerðir sem spanna vítt sýrustigssvið þannig að unnt sé að meta hreyfanleika íðefnisins bæði í jónuðu og ójónuðu ástandi, og a.m.k. þrjár jarðvegsgerðir skulu hafa sýrustig þar sem prófunariðefnið er í hreyfanlegu ástandi.

Tafla 1

Leiðbeiningar fyrir val á jarðvegi til rannsókna á útskolun

Jarðvegsgerð nr.	pH-gildi	Lífrænt kolefni %	Leirinnihald %	Kornastærð (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	leirmold
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	siltmold
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	mold
4	< 4,0–6,0§	< 0,5–1,5§‡	< 10–15§	myldinn sandur
5	< 4,5	> 10#	< 10	myldinn sandur/sandur

(*) Samkvæmt kerfum FAO og USDA (14. heimild).

§ Gildi viðkomandi breytna skulu helst vera á því bili sem er tiltekið. Reynist hins vegar erfitt að finna jarðveg af viðeigandi gerð má una við gildi sem eru undir tilgreindu lágmarki.

‡ Fylgni milli lífræns innihalds og ásogts getur raskast ef um er að ræða jarðveg með minna en 0,3% lífrænt kolefni. Af þeim sökum er mælt með því að notaður sé jarðvegur sem inniheldur að lágmarki 0,3% lífrænt kolefni.

Jarðvegur með mjög hátt kolefnisinnihald (t.d. > 10%) gæti verið lagalega óásættanlegur t.d. til skráningar varnarefna.

27. Stundum er nauðsynlegt að nota aðrar jarðvegsgerðir sem dæmi um svalari svæði, tempraðri svæði og hitabeltissvæði. Kjósi menn því að nota frekar aðrar jarðvegsgerðir skal eiginleikum þeirra lýst út frá sömu mælipáttum og þessar jarðvegsgerðir skulu vera jafnmargbreytilegar að eiginleikum og þær sem lýst er í leiðbeiningunum fyrir val á jarðvegi til rannsókna á útskolun (sjá töflu 1 hér að ofan) og skiptir þá engu þótt þær standist ekki allar viðmiðanir fullkomlega.
28. Í rannsóknunum á útskolun með „eldri leifum“ skal nota eina jarðvegsgerð (12. heimild). Sandinnihald hennar skal vera > 70% og innihald lífræns kolefnis frá 0,5–1,5% (t.d. jarðvegsgerð nr. 4 í töflu 1). Notkun fleiri jarðvegsgerða getur verið nauðsynleg ef gögn um ummyndunarefnið eru mikilvæg.

29. Greina skal allan jarðveg, a.m.k. með tilliti til kornastærðar [hundraðshlutar sands, silts og leirs samkvæmt flokkunarkerfi FAO og USDA (14. heimild)], sýrustígs, plúsjónaskiptagetu, innihalds lífræns kolefnis, þéttleika lausa jarðvegsins (ef um er að ræða hreyfðan jarðveg) og vatnsheldnieiginleika. Mæling á lífmassa örvera er einungis nauðsynleg fyrir jarðveg sem notaður er á öldrunar-/stöðutímabilinu, sem stendur yfir áður en tilraunin með eldri leifum hefst. Upplýsingar um frekari eiginleika jarðvegs (t.d. flokkun jarðvegs, steindafræði leirs, sérstakur yfirborðsflötur) geta verið gagnlegar við túlkun niðurstaðna rannsóknarinnar. Við ákvörðun á eiginleikum jarðvegsins má nota aðferðirnar sem mælt er með í 15., 16., 17., 18. og 19. heimild.

Taka sýna úr jarðvegi og geymsla

30. Jarðvegssýnin skulu tekin úr efsta laginu (efsta jarðvegslag) að hámarksdýpt sem nemur 20 cm. Fjarlægja skal leifar af gróðri, stórfánu og steinum. Jarðvegurinn (að undanskildum þeim sem er notaður í öldrun prófunariðefnisins) er loftþurrkaður við stofuhita (helst milli 20–25 °C). Jarðvegurinn skal aðgreindur með minnstu átaki þannig að upphafleg kornastærð hans breytist sem minnst. Jarðvegurinn er sigtaður í gegnum sigti með möskvastærð ≤ 2 mm. Mælt er með því að jafnað sé vandlega þar eð það eykur samanburðarnákvæmni niðurstaðnanna. Hægt er að geyma jarðveginn fyrir notkun loftþurrkaðan við umhverfishita (12. heimild). Ekki eru sett nein tímamörk um geymslutíma en hafi jarðvegur verið geymdur lengur en í þrjú ár skal endurgreina hann fyrir notkun með tilliti til innihalds lífræns kolefnis og sýrustígs.
31. Nákvæmar upplýsingar eiga að vera tiltækar um sögu staðarins þar sem prófunarjarðvegurinn er tekinn. Upplýsingarnar skulu varða nákvæma staðsetningu [nákvæmlega skilgreind með alþverstaðri merktorvörpun (UTM, Universal Transversal mercator-Projection/European Horizontal Datum) eða hnattstaða], gróðurþekju, meðhöndlun með plöntuvarnarefnum, meðhöndlun með lífrænum og ólífrænum áburði, viðbætur lífrænna efna eða mengun fyrir slysi (12. heimild). Hafi jarðvegurinn verið meðhöndlaður með prófunariðefninu eða efnum með hlíðstæðri byggingu undanfarin fjögur ár skal ekki nota hann við rannsóknir á útskolun.

Prófunarskilyrði

32. Á prófunartímabilinu skulu jarðvegssúlurnar fyrir útskolun hafðar í myrkri við umhverfishita, svo fremi sem hitastiginu er viðhaldið á bilinu ± 2 °C. Mælt er með hitastigi á á bilinu 18–25 °C.
33. Tilbúnu regni (0,01 M CaCl₂) skal bætt stöðugt við á yfirborð jarðvegssúlnanna í skammtinum 200 mm á 48 klst. tímabili⁽²²⁾, en þessi skammtur samsvarar notkun á 251 ml í jarðvegssúlu með 4 cm innra þvermál. Sé þess þörf, að því er varðar þessa prófun, þá er einnig hægt að nota aðra skammta af tilbúnu regni og lengja tímabilið.

Framkvæmd prófunarinnar

Útskolun með móðurprófunariðefni

34. Ómeðhöndlaður, loftþurrkaður og sigtaður jarðvegur (<2 mm) er þjappaður í a.m.k. tvær eins útskolunarsúlur þangað til hann hefur náð u.þ.b. 30 cm hæð. Til að þjöppun verði jöfn er jarðveginum bætt í súlurnar í litlum skömmtum með skeið og þjappaður með bullu á meðan súlurnar eru hristar varlega þangað til yfirborð jarðvegssúlnanna er hætt að sökkva. Jöfn þjöppun er nauðsynleg til að fá samanburðarnákvæmar niðurstöður úr útskolunarsúlunum. Sjá nánari upplýsingar um tækni við að þjappa í súlurnar í 20.–22. heimild. Til að stýra samanburðarnákvæmni í þjöppunarferlinu skal ákvarða heildarþyngd jarðvegsins sem þjappað er í súlurnar⁽²³⁾, og skal þyngd súlnanna tveggja vera svipuð.

⁽²²⁾ Þetta líkir eftir mjög miklum rigningum. Til dæmis er meðalúrkoma í Mið-Evrópu á bilinu 800–1000 mm á ári.

⁽²³⁾ Dæmi um þéttleika fyrir hreyfðan jarðveg eru eftirfarandi:

fyrir sendinn jarðveg 1,66 g · ml⁻¹

fyrir myldinn jarðveg 1,17 g · ml⁻¹

fyrir jarðveg úr myldnum sandi 1,58 g · ml⁻¹

fyrir siltinn jarðveg 1,11 g · ml⁻¹

35. Eftir þjöppun eru jarðvegssúlurnar forbleyttar með tilbúnu regni ($0,01 \text{ M CaCl}_2$) frá botni og upp til að fjarlægja loftið úr gropunum í jarðveginum með vatni. Eftir það er jarðvegssúlunum leyft að jafna sig og umframvatn látið renna af með hjálp þyngdarafis. Aðferðir til að metta súlurnar eru útskýrðar í 23. heimild.
36. Síðan er prófunariðefnið og/eða viðmiðunariðefnið sett í jarðvegssúlurnar (sjá einnig 23.–25. lið). Bera skal lausnir, sviflausnir eða ýrulausnir með prófunar- og/eða viðmiðunariðefninu jafnt yfir yfirborð jarðvegssúluna til að fá einsleita dreifingu lausnanna. Ef mælt er með ísetningu til að koma prófunariðefninu í jarðvegin skal því blandað saman við lítið magn jarðvegs (t.d. 20 g) og sett á yfirborð jarðvegssúlunnar.
37. Síðan er yfirborð jarðvegssúlunnar hulið með diskum úr hertu gleri, glerperlum, trefjaglerssúu eða kringlóttum síupappír til að tryggja jafna dreifingu tilbúna regnsins yfir allt yfirborðið og til að koma í veg fyrir að regndropar raski yfirborði jarðvegsins. Því stærra sem þvermál súlunnar er þeim mun meiri varúðar skal gætt þegar tilbúið regn er sett í jarðvegssúlurnar til að tryggja jafna dreifingu tilbúna regnsins á jarðvegssúlunni. Síðan er tilbúna regninu bætt í jarðvegssúlurnar dropa fyrir dropa með hjálp bullu- eða slöngudælu eða dropatrekt. Skolvökva skal helst safnað í hlutasýni og viðkomandi rúmmál þeirra skráð ⁽²⁴⁾.
38. Eftir útskolun og eftir að runnið hefur niður af súlunum er jarðvegssúlunum skipt upp í viðeigandi fjölda hluta, eftir því hvaða upplýsingar þarf að fá út úr prófuninni, hlutarnir eru dregnir út með viðeigandi leysum eða leysiblöndum og efnagreindir með tilliti til prófunariðefnisins og, þegar við á, ummyndunarefna, með tilliti til heildargeislavirkni og viðmiðunariðefnisins. Skolvökvi eða hlutasýni skolvökva eru efnagreind með tilliti til þessara efna beint eða eftir útdrátt. Þegar notað er geislamerkt prófunariðefni skal sanngreina öll hlutasýni sem innihalda $\geq 10\%$ af þeirri geislavirkni sem notuð var.

Útskolun með eldri leifum

39. Nýr jarðvegur (sem hefur ekki áður verið loftþurrkaður) er meðhöndlaður með skammti sem samsvarar yfirborðsfleti jarðvegssúlunnar (sjá 24. lið) af geislamerktu prófunariðefninu og látinn standa við loftháðar aðstæður samkvæmt prófunaraðferð C.23 (13. heimild). Stöðu(öldrunar)tímabilið skal vera nógu langt til að marktækt magn ummyndunarefna myndist, og mælt er með öldrunartímabili sem nemur einum helmingunartíma prófunariðefnisins ⁽²⁵⁾, en það skal ekki vera lengra en 120 dagar. Fyrir útskolun skal greina eldri jarðvegin með tilliti til prófunariðefnisins og ummyndunarefna þess.
40. Útskolunarsúlurnar eru fylltar að 28 cm hæð með sama jarðvegi (nema loftþurrkuðum) og notaður er í öldrunartilraununum, sem lýst er í 34. lið, og heildarþyngd fylltu jarðvegssúlunnar er einnig ákvörðuð. Jarðvegssúlurnar eru síðan forbleyttar, eins og lýst er í 35. lið.
41. Síðan eru prófunariðefnið og ummyndunarefni þess sett á yfirborð jarðvegssúlunnar í formi eldri jarðvegsleifa (sjá 39. lið) sem jarðvegshluti sem nemur 2 cm. Heildarhæð jarðvegssúlunnar (ómeðhöndlaður jarðvegur + eldri jarðvegur) skal helst ekki fara yfir 30 cm (sjá 34. lið).
42. Útskolunin er framkvæmd eins og lýst er í 37. lið.
43. Eftir útskolun skal greina jarðvegshluta og skolvökva, eins og tilgreint er í 38. lið, með tilliti til prófunariðefnisins, ummyndunarefna þess og geislavirkni sem ekki hefur verið dregin út. Við ákvörðun á hve mikið magn eldri leifa hefur orðið eftir í efsta 2 cm laginu eftir útskolun skal greina þennan hluta sérstaklega.

⁽²⁴⁾ Dæmigert rúmmál skolvökva nemur frá 230–260 ml, sem samsvarar u.þ.b. 92–104% af heildarmagni tilbúna regnsins sem bætt hefur verið á (251 ml) þegar jarðvegssúlur er notaðar sem eru 4 cm að þvermáli og 30 cm að lengd.

⁽²⁵⁾ Í jarðveginum geta myndast fleiri en eitt ummyndunarefni sem geta líka birst á mismunandi tímáttum í ummyndunarrannsókninni. Í slíkum tilvikum getur verið nauðsynlegt að framkvæma rannsóknir á útskolun með eldri leifum á mismunandi aldri.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

44. Gefa skal upp magn prófunaríðefnisins, ummyndunarefna, óútdraganlegra efna og, ef því var bætt við, viðmiðunariðefnisins sem hundraðshluta af upphafsskammti fyrir hvert jarðvegs- og skolvökvaflutasýni. Fyrir hverja súlu skal setja fram myndræna útfærslu með teikningu á ferlum hundraðshluta sem finnast sem fall af dýpt jarðvegsins.
45. Þegar viðmiðunariðefni er haft með í rannsóknunum á útskolun í súlum er hægt að meta útskolun íðefnis á hlutfallslegum kvarða með því að nota hlutfallslega hreyfanleikastuðla (e. *relative mobility factors*) (RMF) (sjá skilgreiningu í 3. viðbæti) (1. og 11. heimild), sem gera kleift að bera saman gögn um útskolun ýmissa íðefna sem fást úr mismunandi jarðvegsgerðum. Dæmi um RMF-gildi fyrir ýmis plöntuvarnarefni eru gefin í 3. viðbæti.
46. Mat á K_{oc} (jafnaður ásogssuðul fyrir lífrænt kolefni) og K_{om} (jafnaður dreifistuðul fyrir lífrænt efni) má einnig fá úr niðurstöðum úr útskolun í súlum með því að nota meðalfjarlægð útskolunar eða ákvarðaða samsvörun milli RMF og K_{om} og K_{oc} , eftir því sem við á (4. heimild), eða með því að beita einfaldri lítskiljukungu (24. heimild). Síðari aðferðina skal þó nota með varúð, einkum þegar tekið er tillit til þess að útskolunarferli felur ekki eingöngu í sér mettuð flæðiskilyrði heldur frekar ómettuð kerfi.

Túlkun niðurstaðna

47. Rannsóknir á útskolun í súlum, sem lýst er í þessari aðferð, leyfa ákvörðun á útskolunar- eða hreyfigetu prófunaríðefnis (í rannsókn á útskolun með móðurefni) og/eða ummyndunarefna þess (í rannsókn á útskolun með eldri leifum) í jarðvegi. Þessar prófanir fela ekki í sér meginlega spá um hegðun útskolunar við skilyrði á vettvangi, en unnt er að nota þær til samanburðar á „útskolunarleika“ tiltekins íðefnis við önnur efni með þekktu útskolunarhegðun (24. heimild). Einnig fer þar ekki fram meginleg mæling á hlutfalli notaðs íðefnis sem gæti borist í grunnvatn (11. heimild). Hins vegar geta niðurstöðurnar úr rannsóknum á útskolun í súlum hjálpað við að ákveða hvort framkvæma þurfi viðbótarprófanir, sem fara að hluta til fram á vettvangi, eða vettvangsprófanir á íðefnum sem sýna mikla hreyfigetu í prófunum á rannsóknarstofu.

Prófunarskýrsla

48. Í skýrslunni skal koma fram:

Prófunaríðefni og viðmiðunariðefni (ef það er notað):

- almennt heiti, efnaheiti, (IUPAC- og CAS-nafnakerfið), CAS-númer, efnafræðileg bygging (þ.m.t. staðsetning merkis ef geislamerkt efni eru notuð) og þeir eðlisefnafræðilegu eiginleikar sem skipta máli,
- hreinleiki (óhreinindi) prófunaríðefnisins,
- geislaefnafræðilegur hreinleiki merkta íðefnisins og sérstök virkni (eftir því sem við á).

Prófunarjarðvegur:

- nákvæm lýsing á staðnum,
- eiginleikar jarðvegsins, s.s. sýrustig, innihald lífræns kolefnis og leirs, kornastærð og þéttleiki lausa jarðvegsins (ef um er að ræða hreyfðan jarðveg),
- virkni örvera í jarðveginum (eingöngu fyrir jarðveg sem er notaður við öldrun prófunaríðefnisins),
- hve lengi jarðvegurinn hefur verið geymdur og geymsluskilyrði.

Prófunarskilyrði:

- dagsetningar rannsókna,
- lengd og þvermál útskolunarsúlna,
- heildarþyngd jarðvegs í jarðvegssúlum,
- magn prófunaríðefnis og, ef við á, viðmiðunariðefnis sem notað er,

- magn, tíðni og tímalengd notkunar á tilbúnu regni,
- hitastig í prófununum,
- fjöldi samhliða prófana (a.m.k. tvær),
- aðferðir við greiningu á prófunariðefni, ummyndunarefni og, eftir því sem við á, viðmiðunariðefni í mismunandi jarðvegshlutum og skolvökva,
- aðferðir við lýsingu á eiginleikum og sanngreiningu á ummyndunarefnum í jarðvegshluta og skolvökva.

Prófunarniðurstöður:

- töflur með niðurstöðum sem gefnar eru upp sem styrkur og sem hundraðshlutfall af notuðum skammti á hvern jarðvegshluta og skolvökva,
- massajöfnuður, ef við á,
- rúmmál skolvökva,
- útskolunarfjarlægð og, eftir því sem við á, hlutfallslegir hreyfanleikastuðlar,
- teiknað línurit af hlutföllum sem finnast í jarðvegshlutum á móti dýpt jarðvegshluta,
- umræða og túlkun niðurstaðna.

HEIMILDIR

- 1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.
- 2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.
- 3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- 4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.
- 5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.
- 6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- 7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- 8) I. viðauki við tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 95/36/EB frá 14. júlí 1995 um breytingu á tilskipun ráðsins 91/414/EBE um markaðssetningu plöntuvarnarefna, Stjtið. EB L 172, 22.7.1995, bls. 8.
- 9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- 11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- 12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

- 13) Eftirfarandi kaflar í þessum viðauka:
- Kafi A.4 Gufuþrýstingur
 - Kafi A.6 Vatnsleysni
 - Kafi A.8 Deilistuðull, hristiflöskuaðferð
 - Kafi A.24 Deilistuðull, háþrýstivökvaskiljunaraðferð
 - Kafi C.7 Niðurbrot án tilstillis lífvera: vatnsrof sem fall af sýrustigi
 - Kafi C.18 Ásog/afsog með hristi- og skilvinduðferð
 - Kafi C.23 Loftháð og loftfirrð ummyndun í jarðvegi
- 14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26, 305 (1962).
- 15) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- 16) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- 17) *ISO Standard Compendium Environment* (1994). *Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis*. First Edition.
- 18) Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- 19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- 20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In *Research Methods in Weed Science*, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). *Soc. Weed Sci.*, Auburn, Alabama, 73-78.
- 21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In *Research Methods in Weed Science*, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). *Soc. Weed Sci.*, Champaign, IL, 190-200.
- 22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 60(1): 49-53.
- 23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. *J. Contam. Hydrol.* 7, 177-217.
- 24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In *Environmental Dynamics of Pesticides* (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.
- 25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris
-

*1. viðbætur***Skilgreiningar og einingar**

Eldri jarðvegsleifar: Prófunariðefni og ummyndunarefni sem finnast í jarðvegi eftir notkun og eftir tímabil sem er hæfilegt fyrir flutnings-, ásogs-, umbrots- og eyðingarferli til að breyta dreifingu og efnafræðilegum eiginleikum nokkurra þeirra íðefna sem notuð eru (1. heimild).

Tilbúið regn: 0,01 M CaCl₂-lausn í eimuðu eða afjónuðu vatni.

Meðalútskolunarfarlægð: Botn jarðvegshluta þar sem uppsafnað endurheimt íðefni er = 50% heildarendurheimt prófunariðefnis [venjuleg útskolunartilraun], eða (botn jarðvegshluta þar sem uppsafnað endurheimt íðefni er = 50% heildarendurheimt prófunariðefnis) — ((þykkt lags úr eldri leifum)/2) [rannsókn á útskolun með eldri leifum]

Íðefni: efni eða blanda.

Skolvökvi: Vatnsfasi sem hripar í gegnum jarðvegspversnið eða jarðvegssúlu (1. heimild).

Útskolun: Ferli þar sem íðefni færast niður í gegnum jarðvegspversnið eða jarðvegssúlu (1. heimild).

Útskolunarfarlægð: Dýpsti jarðvegshluti þar sem ≥ 0,5% af notuðu prófunariðefni eða eldri leifum fannst að loknu útskolunarferli (jafngildir gegnþrengingardýpt).

Greiningarmörk og magngreiningarmörk: Greiningarmörk er ákveðinn styrkur íðefnis en undir þeim styrk er ekki er hægt að greina íðefnið frá gervingi í greiningu. Magngreiningarmörk er ákveðinn styrkur íðefnis en undir þeim styrk er ekki hægt að ákvarða styrkinn með ásættanlegri nákvæmni.

Hlutfallslegur hreyfanleikastuðull: (útskolunarfarlægð prófunariðefnis (cm))/(útskolunarfarlægð viðmiðunariðefnis (cm))

Prófunariðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Ummyndunarefni: Öll íðefni sem myndast við ummyndunarhvörf prófunariðefnisins sem verða fyrir tilstilli lífvera eða án þeirra, þ.m.t. CO₂ og efni sem eru í bundnum efnaleifum.

Jarðvegur: Blanda jarðefna og lífrænna efnisþátta; hinir síðarnefndu eru kolefnis- og köfnunarefnisauðug efnasambönd með mikilli mólþyngd, sem smáar lífverur (aðallega örverur) hrærast í. Jarðveg má meðhöndla í tvenns konar ástandi:

- óhreyfðan, eins og hann hefur þróast í tímans rás, í dæmigerðum lögum af ýmsum jarðvegsgerðum,
- hreyfðan, eins og hann er að jafnaði á ræktuðu landi eða eins og hann er þegar sýni eru tekin með greftri og notuð í þessari prófunaraðferð (2. heimild).

1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

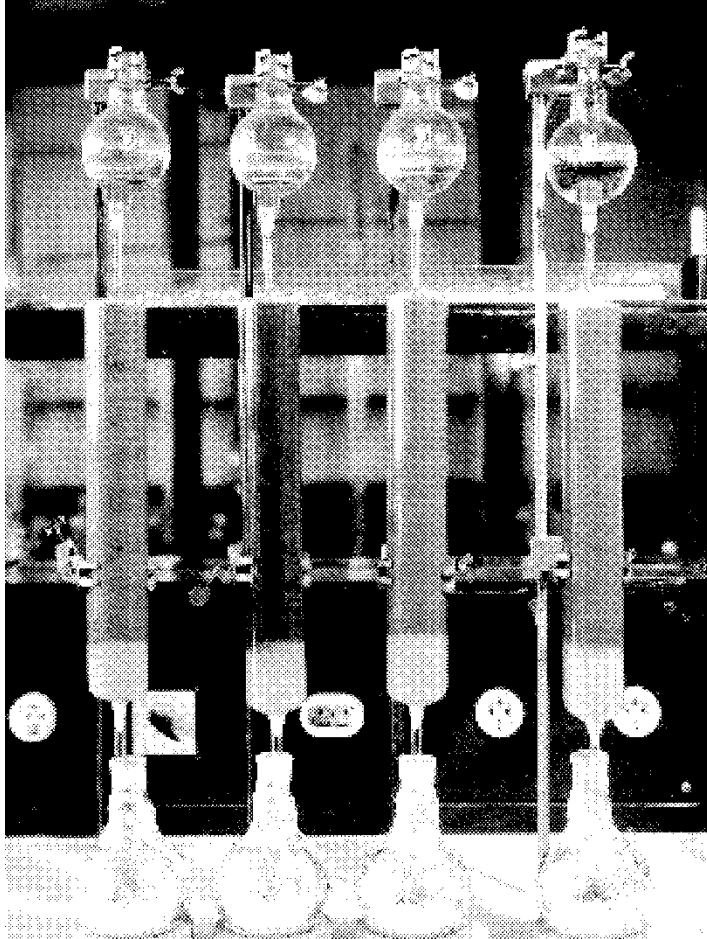
2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

2. viðbætur

Mynd 1

Dæmi um útskolunarsúlur úr gleri sem er ekki hægt að skipta upp

Þær eru 35 cm að lengd og hafa 5 cm innra þvermál (1. heimild)



← Dropatrektir fyrir notkun á tilbúnu regni

← Diskur úr hertu gleri til að koma í veg fyrir rask á jarðvegsyfirborðinu og til að dreifa tilbúna regninu jafnt

← Glersúla sem er fyllt með prófunarjarðvegi (í prófun skulu ljósnæmar vörur vafðar í álþynnu)

← Yfirborðslag úr kvarssandi

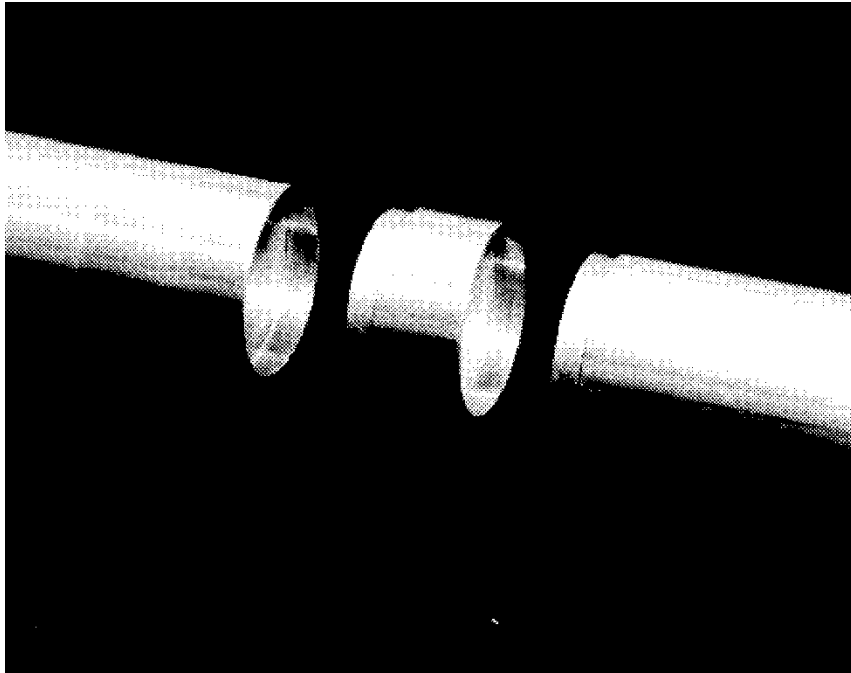
← Tappi úr glerull til að halda jarðveginum í súlunni

← Flaska með kúptum botni til að safna skolvökva, vafin í álþynnu til að útiloka ljósrof

- 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.

Mynd 2

Dæmi um málsúlu sem hægt er að skipta upp og hefur 4 cm innra þvermál (1. heimild)



- 1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

3. viðbætur

Dæmi um hlutfallslega hreyfanleikastuðla (*) (RMF) fyrir ýmis plöntuvarnarefni (1. og 2. heimild) og samsvarandi hreyfanleikaflokka +

Svið hlutfallslegs hreyfanleikastuðuls	Íðefni (RMF)	Hreyfanleikaflokkur
≤ 0,15	Paraþíón (< 0,15), flúródífen (0,15)	I hreyfingarlaus
0,15–0,8	Prófenófos (0,18), própíkónasól (0,23), díasinón (0,28), díúrón (0,38), terbútýlasín (0,52), metíðaðíón (0,56), prómetrýn (0,59), própásín (0,64), alaklór (0,66), metólaklór (0,68)	II eilitíð hreyfanleg
0,8–1,3	Mónúrón (**) (1,00), atrasín (1,03), símasín (1,04), flúómetúrón (1,18)	III í meðallagi hreyfanleg
1,3–2,5	Prómetón (1,67), sýanasín (1,85), brómasíl (1,91), karbútilat (1,98)	IV nokkuð hreyfanleg
2,5–5,0	Karbófúran (3,00), díoxakarb (4,33)	V hreyfanleg
> 5,0	Mónókrótófos (> 5,0), díkrótófos (> 5,0)	VI mjög hreyfanleg

(¹) Hlutfallslegur hreyfanleikastuðull er reiknaður á eftirfarandi hátt (3. heimild):

$$RMF = \frac{\text{útskolunarjarlægð viðmiðunariðefnis (cm)}}{\text{útskolunarjarlægð prófunariðefnis (cm)}}$$

(*) + Önnur kerfi til flokkunar á hreyfanleika íðefnis í jarðvegi grundvallast á R_f-gildum úr þunlagsskiljun í jarðvegi (4. heimild) og á K_{oc}-gildum (5. og 6. heimild).

([†]) Viðmiðunariðefni

- Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium "Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment". Canterbury, UK, 1-3 July 1985.
- Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.
- Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.
- Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.
- McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.
- 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. MAT Á LOSUN FRÁ VIÐI, SEM HEFUR VERIÐ MEÐHÖNDLAÐUR MEÐ VIÐARVARNAREFNI, Í UMHVERFIÐ: RANNSÓKNARSTOFUAÐFERÐ FYRIR VIÐARVÖRUR SEM ERU EKKI MEÐ ÞEKJU OG ERU Í SNERTINGU VIÐ FERSKVATN EÐA SJÓ

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 313 um prófanir (2007). Nauðsynlegt er að magngreina losun frá viði, sem hefur verið meðhöndlaður með viðarvarnarefni, í umhverfið til að unnt sé að meta umhverfisáhættu af meðhöndlaða viðnum. Í þessari prófunaraðferð er lýst rannsóknarstofuaðferð við mat á losun frá viði, sem hefur verið meðhöndlaður með viðarvarnarefni, við tvenns konar aðstæður þar sem losunin gæti farið í umhverfið:
 - Losun frá meðhöndluðum viði í snertingu við ferskvatn. Losun frá yfirborði meðhöndlaðs viðar gæti farið í vatnið.
 - Losun frá meðhöndluðum viði í snertingu við sjó. Losun frá yfirborði meðhöndlaðs viðar gæti farið í sjóinn.
2. Þessi prófunaraðferð er ætluð til prófunar á losun frá viði og viðarvörum sem eru ekki með þekju og eru í snertingu við ferskvatn eða sjó. Notkunarflokkar eru notaðir um allan heim til að flokka líffræðilega hættu sem meðhöndlaða varan verður fyrir. Notkunarflokkarnir skilgreina einnig aðstæðurnar sem meðhöndlaða varan er notuð við og ákvarða hvaða umhverfishólfum (loft, vatn, jarðvegur) getur stafað hætta af viði sem er meðhöndlaður með viðarvarnarefni.
3. Prófunaraðferðin er rannsóknarstofuaðferð til að taka sýni (losunarsýni) úr vatni, sem notað er til að dýfa meðhöndluðum viði í, með sífellt lengri tímabili á milli eftir váhrif. Magn losunar í losunarsýninu tengist yfirborðsfleti viðarins og lengd váhrifanna og flæðið er því áætlað í mg/m²/dag. Þannig er unnt að áætla flæðið (útskolunarhraði) eftir aukinn fjöldi váhrif tímabila.
4. Nota má magn losunar við mat á umhverfisáhættu af meðhöndlaða viðnum.

ATRÍÐI SEM ÞARF AÐ HAFI Á HUGA Í UPPHAFI

5. Gangvirki útskolunar frá viðaryfirborði af völdum ferskvatns er í eðli sínu og umfangi ekki talið vera sambærilegt við útskolun frá yfirborði viðar af völdum sjávar. Að því er við kemur viðarvarnarefnum eða -blöndum, sem notaðar eru til að meðhöndla við sem er notaður í sjávarumhverfi, er nauðsynlegt að rannsaka sérstaklega útskolun vegna sjávar.
6. Þegar um er að ræða við, sem er meðhöndlaður með viðarvarnarefni, skal nota við sem er dæmigerður fyrir við sem notaður er í viðskiptalegum tilgangi. Hann skal meðhöndlaður í samræmi við leiðbeiningar frá framleiðanda viðarvarnarefnisins og samkvæmt viðeigandi stöðlum og nákvæmum skilgreiningum. Tilgreina skal breytur vegna aðlögunar (e. *conditioning*) á viðnum eftir meðhöndlun áður en prófunin hefst.
7. Viðarsýnin sem notuð eru skulu vera dæmigerð fyrir þær vörur sem notaðar eru (t.d. að því er varðar tegund, þéttleika og aðra eiginleika).
8. Hægt er að nota prófunina á við með innþrengingu með þrýstingi (e. *penetrating process*) eða yfirborðsmeðferð eða á meðhöndlaðan við sem hefur fengið skyldubundna viðbótaryfirborðsmeðferð (t.d. málning sem krafa er um að borin sé á viðinn vegna notkunar í viðskiptalegum tilgangi).
9. Samsetning, magn, sýrustig og eðlisástand vatnsins eru mikilvæg við að ákvarða magn, innihald og eðli losunar frá viðnum.

MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

10. Prófunarsýnum af viðnum, sem meðhöndlaður hefur verið með viðarvarnarefni, er dýft í vatn. Vatninu (losunarsýninu) er safnað og það efnagreint margsinnis meðan váhrif tímabilið varir, nægilega oft til að framkvæma tölfræðilega útreikninga. Losunarhraði í mg/m²/dag er reiknaður út frá greiningarniðurstöðum. Skrá skal sýnatökutímabil. Hætta má prófunum með ómeðhöndluðum sýnum ef enginn bakgrunnur greinist í fyrstu þremur gagnapunktunum.

11. Þegar sýni af ómeðhöndluðum viði eru tekin með er hægt að ákvarða bakgrunnsgildi annarrar losunar úr viði en úr viðarvarnarefninu sem var notað.

GÆDAVIÐMIÐANIR

Nákvæmni

12. Nákvæmni prófunaraðferðinnar við að meta losun er háð því að prófunarsýnin sé dæmigerð fyrir við sem hefur verið meðhöndlaður í viðskiptalegum tilgangi, hversu dæmigert vatnið er fyrir raunverulegt vatn og hvernig aðstæðurnar, að því er varðar váhrifafyrirkomulag, eru dæmigerðar fyrir náttúrulegar aðstæður.
13. Ákvarða skal nákvæmni, samkvæmni og endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar áður en prófunin er gerð.

Samanburðarnákvæmni

14. Þrjú vatnssýni eru tekin og greind og meðalgildið er notað sem losunargildi. Samanburðarnákvæmni niðurstaðnanna innan einnar rannsóknarstofu og milli mismunandi rannsóknarstofa er háð ídýfingarfyrikomulaginu og viðnum sem notaður er sem prófunarsýni.

Viðunandi dreifisvið niðurstaðna

15. Dreifisvið niðurstaðna úr þessari prófun er viðunandi ef mismunur á efri og neðri gildum er innan við eitt tugaprep.

AÐSTÆÐUR VIÐ PRÓFUN

Vatn

16. Sviðsmyndir af útskolun ferskvatns: Mælt er með því að nota afjónað vatn (t.d. ASTM D 1193 Tegund II) í útskolunarprófuninni þegar meta skal við sem er látinn verða fyrir váhrifum af vatni. Vatnshitastig skal vera 20 °C \pm 2 °C og mælt sýrustig og vatnshitastig skulu koma fram í prófunarskýrslunni. Greining á sýnum af vatni sem er notað, sem eru tekin fyrir ídýfingu meðhöndluðu sýnanna, gerir það kleift að áætla greind íðefni í vatninu. Þetta er samanburðarprófun til að ákvarða bakgrunnsgildi íðefna sem eru síðan efnagreind.
17. Sviðsmyndir af útskolun sjávar: Mælt er með því að nota tilbúinn sjó (t.d. ASTM D 1141 Staðgöngusjó án þungmálma) í útskolunarprófuninni þegar meta skal við sem er látinn verða fyrir váhrifum af sjó. Vatnshitastig skal vera 20 °C \pm 2 °C og mælt sýrustig og vatnshitastig skulu koma fram í prófunarskýrslunni. Greining á sýnum af vatni sem er notað, sem eru tekin fyrir ídýfingu meðhöndluðu sýnanna, gerir það kleift að áætla greind íðefni í vatninu. Þetta er samanburðarprófun vegna greiningar á bakgrunnsgildum fyrir íðefni sem skipta máli.

Prófunarsýni af viði

18. Viðartegundirnar skulu vera dæmigerðar fyrir viðartegundir sem notaðar eru til prófunar á verkun viðarvarnarefna. Tegundir sem mælt er með eru *Pinus sylvestris L.* (skógarfura), *Pinus resinosa Ait* (reyðarfura) eða *Pinus spp* (tjurfura.) Gera má viðbótarprófanir með öðrum tegundum.
19. Nota skal beinæðóttan (e. *straight grained*), kvistalausan við. Forðast skal efni sem er kvoðukennt í útliti. Viðurinn skal vera dæmigerður fyrir við sem er fáanlegur á markaði. Skrá skal uppruna, þéttleika og fjölda áhringja á hverja 10 mm.
20. Mælt er með því að prófunarsýni af viði séu samstæður af fimm bútum af stærð samkvæmt EN 113 (með málin 25 mm \times 50 mm \times 15 mm) og langhliðarnar samsíða æðamynstrinu í viðnum; þó er hægt að nota önnur mál, t.d. 50 mm \times 150 mm \times 10 mm. Prófunarsýninu skal dýft alveg ofan í vatnið. Í prófunarsýnunum skal vera 100 % safaviður. Sérhvert sýni er merkt á ótvíræðan hátt svo hægt sé að sanngreina það í allri prófuninni.
21. Öll prófunarsýni skulu vera hefluð eða söguð og yfirborðið skal vera ópússað.

22. Til greiningar skal nota a.m.k. fimm samstæður af prófunarsýnum úr viði: þrjár sýnasamstæður eru meðhöndlaðar með viðarvarnarefni, ein sýnasamstæða er ómeðhöndluð og ein sýnasamstæða er til að meta rakainnihald prófunarsýnisins eftir ofnþurrkun áður en meðhöndlun fer fram. Nægilega mörg prófunarsýni eru undirbúin til að unnt sé að velja þrjár samstæður af sýnum, sem liggja innan við 5% af meðalgildi fyrir geymd viðarvarnarefnisins, í öllum prófunarsýnunum.
23. Endum allra prófunarsýnanna er lokað með íðefni sem kemur í veg fyrir að viðarvarnarefnið þrengi sér inn í æðarnar á enda sýnanna eða kemur í veg fyrir útskolun úr sýnunum í gegnum æðarnar í endanum. Þegar þéttiefnið er borið á endann er nauðsynlegt er að gera greinarmun á þeim sýnum sem notuð eru til yfirborðsmeðferðar og þeim sem eru notuð til innþrengingar með þrýstingi. Ekki er nauðsynlegt að bera þéttiefnið á endann fyrir meðhöndlun nema um sé að ræða yfirborðsmeðferð.
24. Endarnir verða að vera opnir fyrir meðhöndlun með innþrengingu með þrýstingi. Þess vegna verður að loka endunum á sýnunum í lok aðlögunartímabilsins Einungis þarf að áætla losunina að því varðar lengdarflöt yfirborðsins. Skoða skal þéttiefni og bera þau aftur á, ef nauðsyn krefur, áður en útskolun hefst og ekki skal bera þau aftur á aftur eftir að útskolun er hafin.

Ídýfngarilát

25. Ílátid er gert úr hvarftregu efni og nógu stórt til að rúma 5 viðarsýni samkvæmt EN113 í 500 ml af vatni; þannig fæst hlutfall milli yfirborðsflatar og vatnsmagns sem nemur 0,4 cm²/ml.

Uppröðun prófunarsýna

26. Prófunarsýnunum er raðað upp á samstæðu þannig að allir óvarðir fletir sýnisins séu í snertingu við vatn.

VERKFERLI VIÐ MEÐHÖNDLUN MEÐ VIÐARVARNAREFNI

Undirbúningur á meðhöndluðum prófunarsýnum

27. Prófunarsýni úr viði, sem á að meðhöndla með viðarvarnarefni í prófuninni, er meðhöndlað með þeirri aðferð sem tilgreind er fyrir viðarvarnarefnið sem getur verið meðhöndlun með innþrengingu með þrýstingi eða yfirborðsmeðferð sem getur verið dýfing, úðun eða penslun.

Viðarvarnarefni sem skal nota í meðhöndlun með innþrengingu með þrýstingi

28. Tilreiða skal viðarvarnarefnislausn sem nær tilgreindri upptöku eða geymd þegar hún er notuð við meðhöndlun með innþrengingu með þrýstingi. Prófunarsýnið úr viðnum er vigtað og mál þess tekin. Meðhöndlun með innþrengingu með þrýstingi skal vera eins og tilgreint er fyrir notkun viðarvarnarefnis á við til notkunar í notkunarflokki 4 eða 5. Sýnið er vigtað aftur eftir meðhöndlun og geymd viðarvarnarefnisins (kg/m³) er reiknuð út frá jöfnunni:

$$\frac{\text{Massi eftir meðhöndlun (kg)} - \text{Massi fyrir meðhöndlun (kg)}}{\text{Rúmmál prófunarsýnisins (m}_3\text{)}} \times \frac{\text{Styrkleiki lausnar (\% massi / massa)}}{100}$$

29. Veita skal því athygli að nota má timbur, sem er meðhöndlað í iðnaðarmeðhöndlunarstöð (t.d. með gegndreypingu undir þrýstingi í lofttæmi), í þessari prófun. Skrá skal þá verkferla sem eru notaðir og greina og skrá geymd efnis sem er meðhöndlað á þennan hátt.

Viðarvarnarefni sem skal nota í yfirborðsmeðferðarferlinu

30. Ferli við yfirborðsmeðferð felur í sér ídýfingu, úðun eða penslun prófunarsýnanna úr viðnum. Ferli og notkunarmagn (t.d. lítrar/m²) skulu vera eins og tilgreint er fyrir yfirborðsmeðferð með viðarvarnarefninu.

31. Einnig skal veita því athygli í þessu tilviki að nota má timbur, sem er meðhöndlað í iðnaðarmeðhöndlunarstöð, í þessari prófun. Skrá skal þá verkferla sem eru notaðir og greina og skrá geymd efnis sem er meðhöndlað á þennan hátt.

Aðlögun á prófunarsýnum eftir meðhöndlun

32. Eftir meðhöndlun skal aðlaga meðhöndluð prófunarsýni, í samræmi við leiðbeiningar frá birgi viðurvarnarefnisins sem notað er við prófunina, samkvæmt kröfum á merkimiða viðurvarnarefnisins eða í samræmi við starfsvenjur við viðskiptalega meðhöndlun eða í samræmi við EN 252 staðalinn.

Undirbúningur og val á prófunarsýnum

33. Eftir aðlögun eftir meðhöndlun er meðalgeymd prófunarsýnanna í hópnum reiknuð út og þrjár dæmigerðar samstæður sýna, með geymd sem er innan við 5% af meðaltali hópsins, eru valdar af handahófi til mælinga á útskolun.

VERKFERLI VIÐ MÆLINGAR Á LOSUN VIÐARVARNAREFNIS

Ídýfingaraðferð

34. Prófunarsýnin eru vegin og síðan dýft alveg á kaf í vatnið og dagsetning og tími eru skráð. Ílátinu er lokað til að draga úr uppgufun.
35. Skipt er um vatn með eftirfarandi millibilum: 6 klst, 1 dagur, 2 dagar, 4 dagar, 8 dagar, 15 dagar, 22 dagar, 29 dagar (ath: þetta er heildartími, ekki millibilstímar). Skrá skal tíma og dagsetningu vatnsskipta og massa þess vatns sem er tekið úr ílátinu.
36. Eftir hvert sinn sem skipt er um vatn er haldið eftir vatnssýni, sem samstæðu af prófunarsýnum hefur verið dýft í, til efnagreiningar síðar.
37. Sýnatökufærlið gefur færi á að reikna út snið losunarmagns miðað við tíma. Geyma skal sýni við aðstæður sem varðveita greiniefnin, t.d. í kælskápi í myrkri til að draga úr örveruvexti í sýninu fyrir greiningu.

MÆLINGAR Á LOSUN

Meðhöndluð sýni

38. Vatn, sem er safnað, er efnagreint m.t.t. virka efnisins og/eða niðurbrots-/ummyndunarefna sem skipta máli, ef við á.

Ómeðhöndluð sýni

39. Söfnun á vatni (losunarsýni) í þessu kerfi og eftirfylgjandi greining á efnum, sem hafa skolast út frá ómeðhöndluðum viðarsýnum, gera það kleift að meta mögulegan losunarhraða viðurvarnarefnis úr ómeðhöndluðum viði. Söfnun og greining á losuninni eftir sífellt lengri váhrifátímabil gera það kleift að meta breytingu losunarhraðans miðað við tíma. Þessi greining er eftirlitsaðferð til að ákvarða bakgrunnsgildi prófunariðefnis í ómeðhöndluðum viði til að staðfesta að viðurinn, sem sýnin komu úr, hafi ekki áður verið meðhöndlaður með viðurvarnarefni.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Efnagreining

40. Vatnið, sem er safnað, er efnagreint og niðurstaðan úr vatnsgreiningunni er gefin upp í viðeigandi einingum, t.d. µg/l.

Skýrslugjöf um gögn

41. Allar niðurstöður eru skráðar. Í viðbætinum er að finna dæmi um ráðlagt skráningarform fyrir eina samstæðu meðhöndlaðra prófunarsýna og yfirlitstöflu til að reikna meðalgildi losunar yfir sérhvert sýnatökumillibil.
42. Daglegt losunarflæði í mg/m²/dag er reiknað með því að taka meðaltal þriggja mælinga úr samhlíða prófununum þremur og deila í það með fjölda ídýfingardaga.

Prófunarskýrsla

43. Að minnsta kosti eftirfarandi upplýsingar skulu tilgreindar í prófunarskýrslunni:
 - heiti birgis viðvarnarefnisins í prófuninni,
 - sérstakt og einkvæmt heiti eða kóði viðvarnarefnisins sem prófað er,
 - viðskiptaheiti eða almennt heiti virka efnisins/virku efnanna ásamt almennri lýsingu á meðefnunum (t.d. meðleysir, resín) og samsetning innihaldsefnanna í % m/m,
 - viðkomandi geymd eða hleðsla (í kg/m³ eða í l/m², eftir því sem við á) sem tilgreind er fyrir við sem er notaður í snertingu við vatn,
 - tegund viðar, sem er notaður, ásamt þéttleika og vaxtarhraða hringja á hverja 10 mm,
 - hleðsla eða geymd viðvarnarefnis sem prófað er og formúla sem notuð er til að reikna geymdina, gefið upp sem l/m² eða kg/m³,
 - aðferð við að bera viðvarnarefnið á þar sem meðhöndlunaráætlunin, sem var notuð við innþrengingu með þrýstingi, er tilgreind og aðferðin við að bera á, ef yfirborðsmeðferð var notuð,
 - dagsetning þegar viðvarnarefnið er borið á og mat á rakainnihaldi í prófunarsýnum, gefið upp sem hundraðshluti,
 - aðlögunaraðferðir sem notaðar voru þar sem tegund, aðstæður og tímalengd eru tilgreind,
 - lýsing á þéttiefni sem er notað á endana og fjöldi skipta sem það er borið á,
 - lýsing á allri síðari meðhöndlun á viðnum, t.d. lýsing á birgi, tegund, eiginleikum og þykkt málningar,
 - tími og dagsetning hverrar ídýfingar, magn vatns sem er notað til ídýfingar prófunarsýna í hvert sinn og magn vatns sem viðurinn sagnar í sig meðan á ídýfingu stendur,
 - öll frávik frá aðferðinni sem lýst er og allir þætti sem gætu hafa haft áhrif á niðurstöðuna.

HEIMILDIR

- 1) Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.
- 2) European Standard, EN 113/A1 — 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.
- 3) European Standard, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.
- 4) European Standard, EN 335 — Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products — Definition of use classes — Part1: General.

- 5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.
 - 6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.
-

I. viðbætur

Skráningarform fyrir prófunaraðferð

Mat á losun frá viði, sem hefur verið meðhöndlaður með viðarvarnarefni, í umhverfið: Rannsóknarstofuaðferð fyrir viðarvörur sem eru ekki með þekju og eru í snertingu við ferskvatn eða sjó

Prófunarstofa	
Viðarvarnarefni	
Birgjarviðarvarnarefnisins	
Sérstakt og einkvæmt heiti eða kóði viðarvarnarefnisins	
Viðskiptaheiti eða almennt heiti viðarvarnarefnisins	
Meðefni	
Viðkomandi geymd að því er varðar við sem er notaður í snertingu við vatn	
Notkun	
Notkunaraðferð	
Notkunardagur	
Formúla sem er notuð til að reikna geymdina:	
Aðlögunaraðferð	
Tímalengd aðlögunar	
Þéttleiki á enda/fjöldi skipta sem það er notað	
Síðari meðhöndlun	Ef upplýsingarnar eiga við.
Prófunarsýni	
Viðartegundir	
Þéttleiki viðarins	(lágmark ... meðalgildi ... hámark)
Vaxtarhraði (hringir á hverja 10 mm)	(lágmark ... meðalgildi ... hámark)
Rakainnihald	

Uppröðun prófunar (*)	Geymd (t.d. kg/m³)
Meðhöndlað „x“	Meðalgildi og staðalfrávik eða dreifisvið fyrir 5 sýni
Meðhöndlað „y“	Meðalgildi og staðalfrávik eða dreifisvið fyrir 5 sýni
Meðhöndlað „z“	Meðalgildi og staðalfrávik eða dreifisvið fyrir 5 sýni
Ómeðhöndlað	
Breytileiki í mælipáttum prófunaraðferðarinnar	t.d. vatnsgæði, mál prófunarsýna, o.s.frv.

(¹) x, y, z eru samhlíða sýnin þrjú

Tími	Vatnsskipti	Massi sýnis		Vatnssupptaka		Vatnssýni				
		Meðhöndlað (meðall)	Ómeðhöndlað g	Meðhöndlað (meðall)	Ómeðhöndlað g	nr.	Ómeðhöndlað pH-gildi	x	y	z
upphaf	Dagsetning	g	g	g	g		pH-gildi	pH-gildi	pH-gildi	pH-gildi
6 klst.						1				
24 klst.						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

2. viðbætur

Skilgreiningar

Íðefni: Efni eða blanda.

Prófunariðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

C.46. UPPSÖFNUN Í BOTNLÆGUM ÁNUM SEM BÚA Í SETI

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 315 um prófanir (2008). Dýr sem búa í lagarbotnum og láta set ofan í sig geta orðið fyrir váhrifum af efnum sem bindast seti (1. heimild). Á meðal þeirra dýra sem láta set ofan í sig gegna lagaránar mikilvægu hlutverki í botni lagarkerfa. Þeir búa í setinu og eru oft útbreiddasta tegundin, einkum á búsvæðum þar sem umhverfisaðstæður eru óhagstæðar öðrum dýrum. Með lífhreyfð í seti og sem bráð geta þessi dýr haft mikil áhrif á lífaðgengi slíkra efna að öðrum lífverum, t.d. fiska sem nærast á botndýrum. Ólíkt grunnsævislífverum grafa lagaránar í botnseti sig niður í setið og láta ofan í sig setagnir undir yfirborði setsins. Sökum þess verða þessar lífverur fyrir váhrifum frá efnum eftir mörgum upptökuleiðum, þ.m.t. með beinni snertingu við mengaðar setagnir og inntöku á þeim, gropuvatni og yfirliggjandi vatni. Sumum tegundum lagarána, sem eru sem stendur notaðar í vísitæfræðilegar prófanir, er lýst í 6. viðbæti.
2. Mælipættir sem einkenna uppsöfnun efnis í lífverum eru í fyrsta lagi stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum (BAF), fasti fyrir upptökumraða sets (k_s) og fasti fyrir útskilnaðarhraða (k_e). Ítarlegar skilgreiningar á þessum mælipáttum er að finna í 1. viðbæti.
3. Til að meta getu efna til uppsöfnunar í lífverum almennt og til að rannsaka uppsöfnun efna, sem hafa tilhneigingu til að skiptast í eða á set, í lífverum er þörf á hólfasértækri prófunaraðferð (1.–4. heimild).
4. Þessi prófunaraðferð er ætluð til að meta uppsöfnun efna, sem tengjast seti, í botnsetsánum. Prófunarefninu er bætt í setið. Notkun á íbættu seti er ætlað að líkja eftir menguðu seti.
5. Þessi aðferð byggist á fyrirliggjandi aðferðum til prófana á eiturhrifum í seti og uppsöfnun í lífverum, (1. og 4.–9. heimild). Önnur gagnleg skjöl eru: umfjöllun og niðurstöður frá alþjóðlegri málstofu (11. heimild) og niðurstaða úr alþjóðlegri hringprófun (12. heimild).
6. Þessi prófun á við um stöðug, hlutlaus lífræn efni sem hafa tilhneigingu til að tengjast seti. Einnig er hægt að mæla uppsöfnun í lífverum á stöðugum, málmlífrænum efnum, sem tengjast seti, með þessari aðferð (12. heimild). Prófunin hentar ekki fyrir málma og önnur snefilefni (11. heimild) án breytinga á tilhögun hennar að því er varðar undirlag og vatnsmagn og hugsanlega stærð vefjasýna.

FORSENDUR OG UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNI

7. Sem stendur eru ekki tiltæk nema nokkur viðurkennd meginleg vensl efnabyggingar og virkni (QSAR) sem varða uppsöfnunarferla í lífverum (14. heimild). Venslin sem eru mest notuð eru fylgni milli uppsöfnunar í lífverum og lífþéttni stöðugra, lífrænna efna og fitusækni þeirra (gefin upp sem logri af deilistuðli oktanóls og vatns ($\log K_{ow}$); sjá skilgreiningu í 1. viðbæti), eftir því sem við á, sem voru þróuð til að lýsa skiptingu efnis milli vatns og fisks. Með þessum venslum hefur einnig verið fastsett fylgni fyrir sethólf (15.–18. heimild). Fylgni $\log K_{ow}$ og logra lífþéttistuðuls (BCF) sem helstu meginleg vensl efnabyggingar og virkni geta verið gagnleg fyrir fyrsta bráðabirgðamat á getu efna, sem tengjast seti, til að safnast upp í lífverum. Þó getur stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum (BAF) orðið fyrir áhrifum af fituefnainnihaldi prófunarlífverunnar og innihaldi lífræns kolefnis í setinu. Þess vegna er einnig hægt að nota deilistuðul fyrir lífrænt kolefni og vatn (K_{oc}) sem helsta þátt til að ákvarða uppsöfnun lífrænna efna, sem tengjast seti, í lífverum.
8. Þessi prófun á við um:
 - stöðug, lífræn efni með $\log K_{ow}$ -gildi á bilinu 3,0 til 6,0 (5. og 19. heimild) og mjög fitusækin efni sem sýna $\log K_{ow}$ sem er hærra en 6,0 (5. heimild),
 - efni sem tilheyra flokki lífrænna efna sem eru þekkt fyrir getu til að safnast upp í lífverum, t.d. yfirborðsvirk efni eða mjög ásogandi efni (t.d. hár deilistuðull fyrir lífrænt kolefni og vatn (K_{oc})).

9. Afla skal upplýsinga um prófunarefnið, s.s. varúðarráðstafanir, viðeigandi geymsluskilyrði, stöðugleika og greiningaraðferðir, áður en rannsókn hefst. Leiðbeiningar um prófun á efnum sem hafa eðlisefnafræðilega eiginleika sem gerir erfitt um vik að framkvæma prófunina eru í 20.–21. heimild. Áður en prófun er gerð á uppsöfnun í lagaránum skulu eftirfarandi upplýsingar um prófunarefnið liggja fyrir:

- almennt heiti, efnahæiti (helst IUPAC-heiti), byggingarformúla, CAS-skráningarnúmer, hreinleiki,
- vatnsleysni (prófunaraðferð A.6 (22. heimild)),
- deilistuðull fyrir oktanól og vatn K_{ow} (prófunaraðferðir A.8 og A.24 (22. heimild)),
- deilistuðull fyrir set og vatn, gefinn upp sem K_d eða K_{oc} (prófunaraðferð C.19 (22. heimild)),
- vatnsrof (prófunaraðferð C.7 (22. heimild)),
- ljósummyndun í vatni (23. heimild),
- gufuþrýstingur (prófunaraðferð A.4 (22. heimild)),
- auðlifbrjótanleiki (prófunaraðferðir C.4 og C.29 (22. heimild)),
- yfirborðsspenna (prófunaraðferð A.5 (22. heimild)),
- vendistyrkur við myndun hneppa (24. heimild).

Auk þess skipta eftirtaldir upplýsingar máli, ef þær eru tiltækar:

- lífniðurbrot í vatnsumhverfinu (prófunaraðferðir C.24 og C.25 (22. heimild)),
 - fasti samkvæmt lögmáli Henrys.
10. Notkun geislamerkra prófunarefna getur auðveldað greiningu vatns- og setsýna og líffræðilegra sýna og þau er hægt að nota til að ákvarða hvort fram skuli fara sanngreining og mæling á niðurbrotsefnum. Aðferðin sem hér er lýst var fullgilt í alþjóðlegri hringprófun (12. heimild) á ^{14}C -merktum efnum. Ef samanlagðar geislavirkar leifar eru mældar er stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum byggður á móðurefninu, þ.m.t. öll niðurbrotsefni sem sitja eftir. Einnig er mögulegt að sameina efnaskiptarannsókn og rannsókn á uppsöfnun í lífverum með greiningu og magnákvörðun á hundradshlutamóðurefni og niðurbrotsefna þess í sýnum sem tekin eru við lok upptökufasans eða við hæsta gildi uppsöfnunar í lífverum. Í öllu falli er mælt með því að útreikningur á stuðli fyrir uppsöfnun í lífverum byggist á styrk móðurefnisins í lífverunni en ekki einungis á samanlögðum geislavirkum leifum.
11. Til viðbótar við eiginleika prófunarefnisins er gerð krafa um aðrar upplýsingar varðandi eiturhrif á ánategundirnar sem á að nota í prófuninni, s.s. miðgildisbanastyrkur (LC_{50}) á tímabilinu sem er nauðsynlegt fyrir upptökufasann, til að tryggja að valdir váhrifastyrkleikar séu miklu lægri en styrkleikar sem valda eitrun. Eiturhrifagildi sem eru leidd út frá langtímarannsóknnum á nær banvænum endapunktum (EC_{50}) skulu hafa forgang, ef þau eru fyrir hendi. Ef slík gögn liggja ekki fyrir getur prófun á bráðum eiturhrifum við sömu skilyrði og í prófun á uppsöfnun í lífverum, eða gögn um eiturhrif eða gögn um aðrar staðgöngutegundir, veitt gagnlegar upplýsingar.
12. Viðeigandi greiningaraðferð með þekktri nákvæmni, samkvæmni og næmi til að ákvarða magn efnisins í prófunarlausnunum, í setinu og í líffræðilega efninu skal vera fyrir hendi ásamt upplýsingum um tilreiðslu og geymslu sýnisins sem og öryggisblöðum um efni. Einnig skulu greiningarmörk prófunarefnisins í vatni, seti og ormavef vera þekkt. Ef notað er geislamerkt prófunarefni skulu sértæk geislavirkni (þ.e. Bq mol^{-1}), staðsetning geislamerktu frumeindarinnar og hlutfall geislavirkni, sem tengist óhreinindum, einnig vera þekkt. Sértæk geislavirkni prófunarefnisins skal vera eins há og mögulegt er í því skyni að greina eins lágan prófunarstyrk og mögulegt er (11. heimild).
13. Upplýsingar um eiginleika setsins sem á að nota (t.d. uppruni sets eða efnisþátta þess, sýrustig og ammoniakstyrkur gropuvatns (set af vetvangi), heildarmagn lífræns kolefnis (TOC), dreifing kornastærðar (% sandur, silt og leir og % þurrvig) skulu liggja fyrir (6. heimild).

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

14. Prófunin samanstendur af tveimur fösom: upptöku(váhrifa)fasanum og útskilnaðar(eftir váhrif)fasanum. Meðan á upptökufasanum stendur eru ormar látnir verða fyrir váhrifum af seti með íbættu prófunarefni, fyllt er upp með endurgerðu vatni og kerfið látið ná jafnvægi eins og við á (11. heimild). Hópar af samanburðarormum eru hafðir við sömu skilyrði án prófunarefnisins.
15. Að því er varðar útskilnaðarfasann eru ormarnir fluttir í set- og vatnskerfi sem er laust við prófunarefnið. Útskilnaðarfasa er nauðsynlegur til að afla upplýsinga um á hvaða hraða prófunarlífverurnar losa prófunarefnið frá sér sem úrgangsefni (19. og 25. heimild). Alltaf er gerð krafa um útskilnaðarfasa nema upptaka á prófunarefninu meðan á váhrifafasanum stendur hafi verið óveruleg (t.d. enginn tölfraðilegur munur á styrk prófunarefnis í prófunar- og samanburðarormum). Ef stöðugt ástand hefur ekki náðst meðan á upptökufasanum stóð er hægt að ákvarða hraða – stuðull fyrir hraða uppsöfnunar í lífverum (BAF_k), fasti fyrir upptökumhraða og fasti fyrir útskilnaðarhraða – með því að nota niðurstöður úr útskilnaðarfasanum. Fylgst er með breytingum á styrk prófunarefnisins í eða á ormunum meðan báðir fasar prófunarinnar standa yfir.
16. Meðan á upptökufasanum stendur eru framkvæmdar mælingar þar til stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum hefur náð sléttu eða stöðugu ástandi. Sjálfgefið er að lengd upptökufasans sé 28 dagar. Fengin reynsla hefur sýnt að 12–14 daga upptökufasi nægi fyrir fjölmörg stöðug, hlutlaus lífræn efni til að ná stöðugu ástandi (6. og 8.–9. heimild).
17. Ef stöðugt ástand næst hins vegar ekki innan 28 daga er útskilnaðarfasinn hafinn með því að flytja ána, sem hafa orðið fyrir váhrifum, í ílát sem innihalda sama miðil án prófunarefnisins. Útskilnaðarfasanum er hætt annaðhvort þegar 10% styrkur mælist í ormunum á 28. degi upptökufasans eða eftir 10 daga að hámarki. Gerð er grein fyrir gildi leifa í ormunum við lok útskilnaðarfasans sem viðbótarendapunkti, t.d. sem leifum sem ekki eru fjarlægðar. Stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum (BAF_{ss}) er helst reiknaður bæði sem hlutfall styrks í ornum (C_o) og í seti (C_s) við sýnilegt, stöðugt ástand og sem stuðull fyrir hraða uppsöfnunar í lífverum, BAF_k sem hlutfallið milli hraðafastanna fyrir upptöku úr seti (k_s) og fasta fyrir útskilnaðarhraða (k_c) þar sem gert er ráð fyrir hraðafræði af fyrstu gráðu. Ef stöðugt ástand næst ekki innan 28 daga skal reikna út stuðul fyrir hraða uppsöfnunar í lífverum (BAF_k) út frá fasta eða föstum fyrir upptöku- og útskilnaðarhraða. Sjá útreikninga í 2. viðbæti. Ef hraðafræði af fyrstu gráðu á ekki við skal nota flóknari líkön (2. viðbætur og 26. heimild).
18. Ef stöðugt ástand næst ekki innan 28 daga er valkvæmt að lengja upptökufasann þannig að hægt sé að gera enn frekari mælingar á hópum af ornum sem hafa orðið fyrir váhrifum, ef þeir eru fyrir hendi, þangað til stöðugu ástandi er náð; samhliða þessu skal samt sem áður hefja útskilnaðarfasann á 28. degi upptökufasans.
19. Fasti fyrir upptökumhraða, fasti fyrir útskilnaðarhraða (eða fleiri en einn fasti ef önnur flóknari líkön eiga í hlut), stuðull fyrir hraða uppsöfnunar í lífverum (BAF_k) og, ef unnt er, öryggismörk fyrir hvern og einn þessara mælipátta eru reiknuð út frá tölvuunnum líkanjöfnum (sjá líkön í 2. viðbæti). Hægt er að ákvarða mátgæði allra líkana út frá fylgnistuðli eða ákvörðunarstuðli (reiknistuðlar nálægt 1 benda til mátgæða).
20. Til að draga úr breytileika í niðurstöðum úr prófunum á lífrænum efnum sem eru mjög fitusækin skal til viðbótar gefa upp stuðla fyrir uppsöfnun í lífverum miðað við fituefnainnihald prófunarlífverunnar og heildarmagn lífræns kolefnis (TOC) í setinu (stuðull fyrir uppsöfnun í lífríki og seti, eða BSAF, í kg af heildarmagni lífræns kolefnis í seti kg⁻¹ fituefnainnihaldi orma). Þessi aðferð byggir á reynslu og fræðilegri fylgni fyrir vatnsrænt umhverfishólf þar sem, að því er varðar nokkra íðefnaflokka, eru skýr tengsl milli möguleika efnis til að safnast upp í lífverum og fitusækni þess, sem hafa verið vel staðfest fyrir fiska sem tilraunalífverur (14., 25. og 27. heimild). Einnig er samband á milli fituefnainnihalds í prófunarfiskum og merkjanlegri uppsöfnun slíkra efna í lífverum. Að því er varðar botnlægar lífverur hefur svipuð fylgni fundist, (15.–18. heimild). Ef nægur vefur úr ornum er fyrir hendi er hægt að ákvarða fituefnainnihald tilraunadýranna út frá sama líffræðilega efni og notað er til að ákvarða styrk prófunarefnisins. Þó er hagkvæmt að nota aðlöguð samanburðardýr, a.m.k. við upphaf eða helst við lok upptökufasans, til að mæla fituefnainnihaldið, sem síðan hægt er að nota til að staðla gildi stuðuls fyrir uppsöfnun í lífverum

GILDI PRÓFUNARINNAR

21. Prófunin gildir því aðeins að eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

- uppsöfnuð afföll orma (samanburður og meðhöndlun) fram til loka prófunarinnar skal ekki fara yfir 20% af upphaflegum fjölda.
- Auk þess skal sýna fram á að ormarnir grafi sig í setið til að hámarksváhrif verði möguleg. Sjá nánar í 28. lið.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Prófunartegund

22. Hægt er að nota fjölmargar tegundir lagarána í prófunina. Þær tegundir sem oftast eru notaðar eru taldar upp í 6. viðbæti.
23. Gera skal prófanir á eiturrhrifum (96 klst. einungis í vatni) með reglulegu millibili (t.d. mánaðarlega) með viðmiðunareiturefni, s.s. kalíumklóríði (KCl) eða koparsúlfati (CuSO₄) (1. heimild), til að sýna fram á heilbrigðisástand tilraunadýranna (1. og 6. heimild). Ef viðmiðunarprófanir á eiturrhrifum eru ekki gerðar með reglulegu millibili skal athuga framleiðslulotu lifveranna, sem á að nota í prófun á uppsöfnun í seti, með því að nota viðmiðunareiturefni. Mælingar á fituefnainnihaldi geta einnig veitt gagnlegar upplýsingar um ástand dýranna.

Ræktun prófunarlifvera

24. Til að hafa nægilega marga orma til að framkvæma prófanir á uppsöfnun í lifverum þarf e.t.v. að geyma ormana í varanlegri rannsóknarstofurækt með einni tegund. Rannsóknarstofuræktunaraðferðir fyrir valdar prófunartegundundir eru teknar saman í 6. viðbæti. Sjá nánari upplýsingar í heimildum 8.–10., 18. og 28.–32.

Búnaður

25. Að því er varðar alla hluta búnaðarins skal forðast að nota efni sem kunna að leysast upp, ásoga prófunarefni eða leka öðrum efnum og hafa skaðleg áhrif á tilraunadýrin. Hægt er að nota stöðluð réttthyrnd eða sívöl ílát, gerð úr efnafræðilega óvirku efni og af viðeigandi stærð, í samræmi við þyngdarhlutfall, þ.e. fjölda prófunarorma. Forðast skal að nota mjúkar plastleiðslur til að gefa vatn eða loft. Nota skal pólýtetrafluóretýlen, ryðfrítt stál og/eda gler í allan búnað sem kemst í snertingu við prófunarmiðilinn. Að því er varðar efni með háan ásogsstuðul, s.s. tilbúin pípretróid, getur verið nauðsynlegt að nota sílanhúðað gler. Í slíkum tilvikum verður að fleygja búnaðinum að lokinni notkun (5. heimild). Að því er varðar geislamerkt prófunarefni og rokkgjörn efni skal þess gætt að forðast strípun og að strípað prófunarefni sleppi út. Nota skal gildrur (t.d. gasþvottaflöskur úr gleri) sem innihalda viðeigandi íseyg efni til að halda eftir öllum leifum sem gufa upp úr prófunarlátunum (11. heimild).

Vatn

26. Yfirliggjandi vatnið skal vera með þeim gæðum að prófunartegundin lifi af aðlögunar- og prófunartímann og að ekki komi fram hjá henni nein óeðlileg einkenni í útliti eða atferli. Mælt er með að nota endurgert vatn samkvæmt prófunaraðferð C.1 (25. heimild) sem yfirliggjandi vatn í prófuninni sem og í rannsóknarstofuræktun á ormunum. Sýnt hefur verið fram á að fjölmargar prófunartegundir geta lifað, vaxið og æxlast í þessu vatni (8. heimild) og að hámarksstöðlun prófunar- og ræktunarskilyrða næst. Lýsa skal eiginleikum vatnsins, a.m.k. eftir sýrustigi, eðlisleidni og hörku. Greining á vatninu fyrir notkun m.t.t. mengandi efna í snefilmagni gæti veitt gagnlegar upplýsingar (4. viðbætur).
27. Gæði vatns skulu vera stöðug allan prófunartímann. pH-gildi yfirliggjandi vatns skal vera á bilinu 6–9. Heildarharka skal vera á bilinu 90–400 mg CaCO₃ á hvern lítra við upphaf prófunarinnar (7. heimild). Styrkbil fyrir sýrustig og hörku í endurgerða vatninu, sem getið er, er gefið í prófunaraðferð C.1 (25. heimild). Ef grunur leikur á um vixlverkun milli jóna sem valda hörku og prófunarefnis skal nota vatn með minni hörku. Í 4. viðbæti eru teknar saman viðbótarviðmiðanir um viðunandi þýnningarvatn samkvæmt OECD-viðmiðunarreglu um prófanir „OECD TG 210“ (34. heimild).

Set

28. Setið skal vera af þeim gæðum að prófunarlífverurnar lifi af aðlögunar- og prófunartímann og geti helst fjölgað sér án þess að fram komi nein óeðlileg einkenni í útliti eða atferli. Ormarnir skulu grafa sig í setið. Atferli við að grafa sig niður getur haft áhrif á váhrifin og þar af leiðandi á stuðul fyrir uppsöfnun í lífverum. Þess vegna skal skrá það ef prófunarlífverur forðast setið eða atferli þeirra við að grafa sig niður ef gruggið í yfirliggjandi vatninu býður upp á slíkar athuganir. Ormarnir (samanburður og meðhöndlun) skulu grafa sig í setið innan sólarhrings eftir að þeim er bætt í prófunarilátin. Ef prófunarlífverurnar grafa sig ekki niður í setið eða forðast það (t.d. yfir 20 % í lengri tíma en helming upptökufasans) bendir þetta til þess að annaðhvort séu prófunarskilyrði ekki við hæfi eða að prófunarlífverurnar séu ekki heilbrigðar eða að styrkur prófunarefnisins kalli þetta atferli fram. Í slíkum tilvikum skal stöðva prófunina og endurtaka hana við bætt skilyrði. Hægt er að fá viðbótarupplýsingar um inntöku á seti með því að nota aðferðirnar sem lýst er í 35.–36. heimild þar sem inntaka prófunarlífveranna á seti eða val á ögnum er tilgreint. Ef unnt er að fylgjast með því skal skrá hvort saurkúlur, sem benda til þess að ormarnir láti setið ofan í sig, eru til staðar á yfirborði setsins eða ekki og taka þetta til athugunar við túlkun á prófunarniðurstöðum að því er varðar váhrifaleiðir.
29. Mælt er með gerviseti, að stofni til úr tilbúnum jarðvegi sem lýst er í prófunaraðferð C.8 (40. heimild), til notkunar, bæði í prófanirnar og rannsóknarstofuræktanir á ornum (5. viðbætur) þar eð náttúrulegt set af viðeigandi gæðum stendur kannski ekki til boða allan ársins hring. Auk þess geta lífverur sem eru upprunnar á náttúrulegu seti sem og tilvist örmengunarefna í því haft áhrif á prófunina. Fjöldmargar prófunartegundir geta lifað, vaxið og æxlast í gervisetinu (8. heimild).
30. Lýsa skal eiginleikum gervisetsins, a.m.k. eftir uppruna innihaldsefnanna, dreifingu kornastærðar (hundraðshlutfall af sandi, silti og leir), heildarmagni lífræns kolefnis, vatnsinnihaldi og sýrustigi. Mæling á möguleika á afoxun/oxun er valkvæð. Þó er hægt að nota náttúrulegt set af ömenguðum stöðum sem prófunar- og/eða ræktunarset (1. heimild). Lýsa skal a.m.k. uppruna (söfnunarstað), sýrustigi og ammoníaki í gropuvatninu, heildarmagni lífræns kolefnis, dreifingu kornastærðar (hundraðshlutfall af sandi, silti og leir), og hlutfalli vatnsinnihalds (6. heimild) í náttúrulegu seti. Ef búist er við ammoníakmyndun er mælt með því að áður en prófunarefni er bætt í náttúrulegt set sé setið undirbúið í sjö daga við sömu skilyrði og verða síðan ríkjandi í prófuninni. Við lok þessa undirbúningstímabils skal fjarlægja yfirliggjandi vatn og fleygja því. Greining á setinu eða efnisþáttum þess fyrir notkun m.t.t. örmengunarefna gæti veitt gagnlegar upplýsingar.

Tilreiðsla

31. Meðhöndlun á náttúrulegu seti fyrir notkun í rannsóknarstofu er lýst í 1., 6. og 44. heimild. Tilreiðsla á gerviseti er lýst í 5. viðbæti.

Geymsla

32. Geymsla á náttúrulegu seti á rannsóknarstofu skal standa yfir eins stutt og mögulegt er. Í U.S. EPA (6. heimild) er mælt með hámarksgeymslutíma sem nemur 8 vikum við 4 ± 2 °C í myrkri. Ekki skal vera neitt kollrúm yfir setinu í geymsluilátunum. Ráðleggingar um geymslu á gerviseti eru gefnar í 5. viðbæti.

Prófunarefnið sett í

33. Prófunarefninu er bætt í setið. Íbættingaraðferðin felur í sér að eitt eða fleiri innihaldsefni setsins eru þakin með prófunarefninu. Til dæmis er hægt að rennbleyta kvarssandinn eða hluta hans (t.d. 10 g af kvarssandi á hvert prófunarilát) með lausn með prófunarefninu í hentugum leysi sem er síðan látin gufa rólega upp til fulls. Þá er hægt að blanda húðaða hlutanum saman við blautt setið. Taka verður tillit til sandmagnsins sem er að finna í prófunarefninu og sandblöndunni við tilreiðslu á setinu, þ.e. af þeim sökum skal nota minni sand við tilreiðslu á setinu (6. heimild).

34. Að því er varðar náttúrulegt set er hægt að bæta prófunarefninu við með íbætingu í þurrkaðan hluta af setinu, eins og lýst er hér að framan varðandi gervisetið, eða með því að hræra prófunarefnið í blautt set og láta síðan uppleysandi efni gufa upp, ef það er notað. Hentugir leysar fyrir íbætingu á blautu seti eru etanól, metanól, etýlenglykólmonómetýletri, etýlenglykóldímetýletri, dímetýlformamíð og trietýlenglykól (5. og 34. heimild). Eiturhrif og rokgírni leysisins og leysni prófunarefnisins í leysinum sem er valinn skulu vera helsta viðmiðunin fyrir valinu á hentugu uppleysandi efni. Viðbótarleiðbeiningar um íbætingaraðferðir eru gefnar í „Environment Canada“ (1995) (41. heimild). Þess skal gætt að tryggja að prófunarefninu, sem er bætt við setið, sé dreift vandlega og jafnt í setið. Greina skal samhliða prófanir með undirsýnum af íbætta setinu til að kanna styrk prófunarefnisins í setinu og til að ákvarða einsleitni dreifingarinnar á prófunarefninu.
35. Um leið og búið er að tilreiða íbætt set með yfirliggjandi vatni er æskilegt að prófunarefnið geti aðskilist milli setsins og vatnsfasans. Þetta skal helst gert við þau hita- og lofunarskilyrði sem notuð eru í prófuninni. Viðeigandi jafnvægistími er set- og efnasértækur og getur verið allt frá klukkustundum upp í nokkra daga og í sjaldgæfum tilvikum allt að nokkrum vikum (4–5 vikur) (28. og 42. heimild). Í þessari prófun er ekki beðið eftir að jafnvægi náist en mælt er með jafnvægistíma á bilinu 48 klst. til 7 dagar. Hægt er að nota lengri tíma til að láta íbætta setið ná jafnvægi eða eldast, háð tilganginum með rannsókninni, t.d. ef það á að líkja eftir umhverfisaðstæðum (11. heimild).

FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

Forprófun

36. Gagnlegt getur verið að framkvæma forprófun til að finna bestu skilyrði í endanlegu prófuninni, t.d. velja mismunandi styrk prófunarefnis og lengd upptöku- og útskilnaðarfasanna. Athuga skal og skrá atferli ormannna, þ.e. ef þeir forðast setið, þ.e. ef ormarnir sleppa úr setinu, sem getur stafað af prófunarefninu og/eða af setinu sjálfu, meðan á forprófun stendur. Ef þeir forðast setið er einnig er hægt að nota það sem endapunktur um nær banvæn áhrif í forprófun til að meta styrk prófunarefnis eða -efna sem á að nota í prófun á uppsöfnun í lífverum.

Váhrifaskilyrði

Lengd upptökufasa

37. Prófunarlífverurnar eru látnar verða fyrir váhrifum af prófunarefninu meðan á upptökufasanum stendur. Taka skal fyrsta sýnið 4–24 klst. eftir að upptökufasi hefst. Upptökufasinn skal vara í allt að 28 daga (1., 6. og 11. heimild) nema hægt sé að sýna fram á að jafnvægi hafi náðst fyrr. Stöðugt ástand verður þegar: i. ferill fyrir stuðul uppsöfnunar í lífverum á hverju sýnatökutímabili sem fall af tíma er samhliða tímaásnum; ii. þrjár mælingar í röð á stuðli fyrir uppsöfnun í lífverum í sýnum, sem eru tekin með a.m.k. tveggja daga millibili, gefa niðurstöður þar sem munur milli mælinga er innan við 20% og iii. enginn marktækur munur er á sýnatökutímabilunum þremur (byggt á tölfræðilegum samanburði, t.d. dreifningreiningu og aðhvarfsreiningu). Ef stöðugt ástand næst ekki innan 28 daga má enda upptökufasann með því að hefja útskilnaðarfasann og hægt er að reikna stuðul fyrir hraða uppsöfnunar í lífverum (BAF_K) út frá föstum fyrir upptöku- og útskilnaðarhraða (sjá einnig 16.–18. lið).

Lengd útskilnaðarfasa

38. Taka skal fyrsta sýnið á bilinu 4–24 klst eftir að útskilnaðarfasí hefst þar eð örur breytingar geta orðið á upphafstímabilinu að því er varðar leifar í vefjum. Mælt er með því að hætta útskilnaðarfasanum, annað hvort þegar styrkur prófunarefnisins er undir 10% af styrknum við stöðugt ástand eða eftir 10 daga að hámarki. Gerð er grein fyrir gildi leifa í ormunum við lok útskilnaðarfasans sem aukaendapunktur. Lengd tímabilsins getur hins vegar ráðist af lengd þess tímabils þar sem styrkur prófunarefnisins í ormunum er yfir greiningarmörkunum.

Prófunarlífverur

Fjöldi orma í prófun

39. Fjöldi orma í prófun skal gefa ormavefsmassa sem tryggir að massi prófunarefnis í hverju sýni við upphaf upptökufasans og við lok útskilnaðarfasans, eftir því sem við á, sé umtalsvert meiri en greiningarmörkin fyrir prófunarefnið í líffræðilegu efni. Í áður nefndum áföngum upptöku- og útskilnaðarfasans er styrkurinn í tilraunadýrunum yfirleitt hlutfallslega lágur (6., 8. og 18. heimild). Þar eð þyngd hvers ána af mörgum tegundum lagarána er mjög lítil (blautvigt hvers og eins að því er varðar blóðmaðk (*Lumbriculus variegatus*) og *Tubifex tubifex* er 5–10 mg) má hópa orma í tilteknu íláti samhliða prófunar saman til vigtunar og greiningar á prófunarefni. Að því er varðar prófunartegundir þar sem þyngd hvers dýrs er meiri (t.d. *Branchiura sowerbyi*) má nota samhliða prófanir sem innihalda eitt dýr en í slíkum tilvikum skal fjölga samhliða prófunum í fimm fyrir hvern sýnatökustað (11. heimild). Þó skal veita því athygli að *B. sowerbyi* var ekki tekin með í hringprófuninni (12. heimild) og því er ekki mælt með að nota hana sem ákjósanlega tegund í aðferðinni.
40. Nota skal orma af svipaðri stærð (að því er varðar *L. variegatus*, sjá 6. viðbæti). Þeir skulu vera af sama uppruna og vera fullvaxnir eða stór dýr í sama aldursflokki (sjá 6. viðbæti). Þar eð þyngd og aldur dýrs getur haft marktæk áhrif á gildi stuðla fyrir uppsöfnun í lífverum (t.d. vegna mismunandi fituefnainnihalds og/eða egg eru fyrir hendi) skal skrá þessa mælipætti nákvæmlega. Til að mæla meðaltal blaut- og þurrvigtar skal vega undirsýni af ornum áður en prófun hefst.
41. Að því er varðar *Tubifex tubifex* og blóðmaðk er búist við æxlun á prófunartímabilinu. Ef engin æxlun á sér stað í prófun á uppsöfnun í lífverum skal það skráð og tekið til athugunar við túlkun á prófunarniðurstöðum.

Hleðsla

42. Nota skal há hlutföll milli sets og orma og milli vatns og orma til að lágmarka minnkun á styrk prófunarefnisins í setinu meðan á upptökufasanum stendur og til að forðast að styrkur uppleysts súrefnis minnki. Hleðsluhlutfall, sem valið er, skal einnig samsvara þéttleika tegundarinnar, sem valin er, frá náttúrunnar hendi (43. heimild). Að því er varðar *Tubifex tubifex* er t.d. mælt með hleðsluhlutfalli sem nemur 1–4 mg af ormavef (blautvigt) á hvert gramm af blautu seti (8. og 11. heimild). Í 1. og 6. heimild er mælt með hleðsluhlutfalli sem nemur ≤ 1 g af þurrvigt ormavefs á hver 50 g af lífrænu kolefni í setinu fyrir *L. variegatus*.
43. Ormar, sem notaðir eru í prófunina, eru teknir úr ræktuninni með því að sigta ræktunarsetið. Dýrin (fullvaxnir eða stórir ormar án merkja um nýlega skiptingu) eru flutt í glerskálar (t.d. petrískálar) sem innihalda hreint vatn. Ef prófunarskilyrði eru frábrugðin ræktunarskilyrðum ætti 24. klst. aðlögunarfasi að nægja. Fyrir vigtun skal fjarlægja umframvatn af ormunum. Þetta er hægt að gera með því að leggja ormana varlega á forvætta pappírþurrku. Ekki er mælt með að nota idrægan pappír til að þerra ormana því það getur valdið þeim streitu eða skaddað þá. Brunson o.fl. (1998) mæltu með því að nota óþerraða orma sem væru u.þ.b. 1,33 sinnum lífmassamarkmiðið. Þessi 33% til viðbótar samsvara mismuninum á þerruðum og óþerruðum ormunum.
44. Við upphaf upptökufasans (dagur 0 í prófuninni) eru prófunarlífverurnar teknar úr aðlögunarílatinu og dreift af handahófi í ílát (t.d. petrískálar) sem innihalda endurgert vatn með því að setja tvo orma í senn í hvert ílát þangað til hvert ílát inniheldur tíu orma. Hver þessara ormahópa er síðan fluttur af handahófi yfir í aðskilin prófunarílát, t.d. með því að nota mjúka töng úr stáli. Prófunarílatin eru síðan látin standa við prófunarskilyrði.

Fóðrun

45. Í ljósi þess að næringarefnainnihald gervisetsins er lítið skal bæta setið með fóðurgjafa. Til þess að váhrifin á prófunarlífverurnar séu ekki vanmetin, t.d. með því að velja að gefa ómengað fóður, skal bæta fóðri, sem er nauðsynlegt til að prófunarlífverurnar æxlist og vaxi, í setið um leið og eða áður en prófunarefnið er sett í (sjá 5. viðbæti).

Hlutfall sets og vatns

46. Mælt er með að hlutfall sets og vatns sé 1:4 (45. heimild). Þetta hlutfall telst heppilegt til að viðhalda súrefnisstyrk við hæfileg gildi og til að komast hjá uppsöfnun ammoníaks í yfirliggjandi vatninu. Súrefnisinnihaldi í yfirliggjandi vatni skal haldið við $\geq 40\%$ metnun. Lofta skal yfirliggjandi vatnið í prófunarlátunum varlega (t.d. 2–4 bólar á sekúndu) með Pasteur-pípettu sem er staðsett u.þ.b. 2 cm ofan við yfirborð setsins til að lágmarka truflun í setinu.

Ljós og hiti

47. Ljósloftan í ræktuninni og prófuninni er 16 klukkustundir (1. og 6. heimild). Halda skal ljósstyrk á prófunarsvæðinu við u.þ.b. 500–1000 lx. Hitastigið skal vera 20 ± 2 °C meðan prófunin stendur yfir.

Prófunarstyrkleikar

48. Einn prófunarstyrkur (eins lágur og hægt er) er notaður til að ákvarða hraða upptöku en nota má annan (hærrí) styrk (t.d. 46. heimild). Í því tilviki eru tekin sýni og greind við stöðugt ástand á 28. degi eða eftir það til að staðfesta stuðul fyrir uppsöfnun í lífverum sem er mældur við lægri styrkinn (11. heimild). Velja skal hærri styrkinn þannig að hægt sé að útiloka skaðleg áhrif (t.d. með því að velja u.þ.b. 1% af lægsta þekktu styrk með langvinn áhrif EC_x sem er leiddur út frá rannsóknnum, sem skipta máli, á langvinnnum eiturrifum). Lægri prófunarstyrkurinn skal vera umtalsvert hærri en greiningarmörkin í seti og líffræðilegum sýnum með greiningaraðferðinni sem er notuð. Ef hrifstyrkur prófunarefnisins er nálægt greiningarmörkum er mælt með notkun á geislamerktu prófunarefni með mikilli, sértækri geislavirkni.

Samhliða sýni með meðhöndlun og til samanburðar

49. Lágmarksfjöldi samhliða sýna með meðhöndlun fyrir mælingar á hraða skal vera 3 á hvern sýnatökustað (11. heimild) í öllum upptöku- og útskilnaðarfasanum. Nota skal samhliða ílát til viðbótar, t.d. fyrir valfrjálsa viðbótarsýnatökudaga. Vegna útskilnaðarfasans er samsvarandi fjöldi samhliða sýna tilreiddur með óíbættu seti og yfirliggjandi vatni þannig að hægt sé að flytja meðhöndlaða orma úr völdum ílátum prófana með meðhöndlun yfir í ílát prófana án meðhöndlunar við lok upptökufasans. Heildarfjöldi samhliða prófana með meðhöndlun skal nægja fyrir bæði upptöku- og útskilnaðarfasann.
50. Að öðrum kosti er hægt að láta orma, sem voru valdir til sýnatöku í útskilnaðarfasanum, verða fyrir váhrifum í einu stóru ílát sem inniheldur íbætt set úr sömu framleiðslulotu og notuð var fyrir hraða upptöku. Sýna skal fram á að prófunarskilyrðin (t.d. dýpt sets, hlutfall sets og vatns, hleðsla, hitastig, vatnsgæði) eru sambærileg og í ílátum samhliða prófunar sem eru valin fyrir upptökufasann. Við lok upptökufasans skal taka vatn, set og ormasýni úr þessu ílát til greiningar og fjarlægja skal hæfilegan fjölda af stórum ormum, sem sýna engin merki um nýlega skiptingu, varlega og flytja þá í ílát samhliða prófana sem voru tilreidd fyrir útskilnaðarfasann (t.d. tíu lífverur á hvert ílát samhliða prófunar).
51. Ef enginn leysir, annar en vatn, er notaður skal tilreiða a.m.k. 9 ílát samhliða prófana með neikvæðum samanburði (tekið er sýni úr a.m.k. 3 í upphafi, 3 við lok upptöku og 3 við lok útskilnaðar) til líffræðilegra greininga og bakgrunnsgreininga. Ef uppleysandi efni er notað til að setja prófunarefnið í skal keyra samanburðarprófun með leysi (taka skal sýni úr a.m.k. 3 ílátum samhliða prófana í upphafi, 3 við lok upptökufasans og 3 við lok útskilnaðarfasans). Í því tilviki skal tilreiða a.m.k. 4 ílát samhliða prófana með neikvæðum samanburði (án leysis) til sýnatöku við lok upptökufasans. Hægt er að bera þessi samhliða sýni líffræðilega saman við samanburðinn með leysinum til að afla upplýsinga um hugsanleg áhrif leysisins á prófunarlífverurnar. Nánari upplýsingar eru gefnar í 3. viðbæti.

Tíðni mælinga á vatnsgæðum

52. Að lágmarki skal mæla eftirtaldir vatnsgæðabreytur í yfirliggjandi vatni í upptöku- og útskilnaðarfasanum:

Hitastig	í einu íláti á hverju meðhöndlunarstigi á hverjum sýnatökudegi og í einu samanburðarláti einu sinni í viku og við upphaf og lok upptöku- og útskilnaðartímabils; einnig má skrá hitastig í umhverfi þess (andrúmsloft eða vatnsbað) eða í einu dæmigerðu prófunarláti, t.d. samfelld eða einu sinni á klukkustund.
Innihald uppleysts súrefnis	í einu íláti á hverju meðhöndlunarstigi og í einu samanburðarláti á hverjum sýnatökudegi; gefið upp sem mg/L og % mettunargildi lofts.
Loftbirgðir	athugaðar a.m.k. einu sinni á dag (virkir dagar) og aðlöguð ef nauðsyn krefur.
Sýrustig	í einu meðhöndlunariláti á hverju meðhöndlunarstigi á hverjum sýnatökudegi og í einu samanburðarláti einu sinni í viku og við upphaf og lok upptöku- og útskilnaðartímabilsins.
Heildarharka vatns	a.m.k. í einu meðhöndlunariláti og einu íláti samanburðarprófunar við upphaf og lok upptöku- og útskilnaðartímabilsins, gefin upp sem mg/l CaCO ₃ .
Heildarammoniaksinnihald	a.m.k. í einu meðhöndlunariláti og einu íláti samanburðarprófunar við upphaf og lok upptöku- og útskilnaðartímabilsins, gefið upp sem g/l NH ₄ ⁺ eða NH ₃ eða heildarammoniak-N.

Sýnataka og greining á ormum, seti og vatni*Sýnatökuáætlun*

53. Dæmi um sýnatökuáætlanir fyrir 28 daga upptökufasa og 10 daga útskilnaðarfasa eru gefin í 3. viðbæti.
54. Sýni eru tekin úr vatni og seti í prófunarlátunum til að ákvarða styrk prófunarefnisins áður en ormarnir eru settir í þau og meðan á upptöku- og útskilnaðarfasanum stendur. Meðan á prófuninni stendur er styrkur prófunarefnisins ákvarðaður í ormum, seti og vatni til að vakta dreifingu prófunarefnis í hölfum prófunarkerfisins.
55. Tekin eru sýni úr ormum, seti og vatni a.m.k. sex sinnum meðan á upptöku- og útskilnaðarfasanum stendur.
56. Sýnatöku er haldið áfram þangað til sléttu (stöðugu ástandi) er náð (sjá 1. viðbæti) eða í 28 daga. Ef sléttu er ekki náð innan 28 daga er útskilnaðarfasinn hafinn. Þegar útskilnaðarfasinn hefst eru valdir ormar fluttir yfir í ílát samhliða prófunar sem innihalda ómeðhöndlað set og vatn (sjá einnig 17. og 18. lið).

Sýnataka og undirbúningur sýnis

57. Vatnssýni eru tekin með því að umhella, sjúga upp eða pípla nægu magni til að mæla gæði prófunarefnisins í sýninu.
58. Yfirliggjandi vatni, sem eftir er, er umhellt varlega eða sogið upp úr prófunarlátinu eða -ílátunum. Taka skal sýni úr seti varlega til að valda ormum sem minnstu ónæði.
59. Allir ormar eru fjarlægðir úr íláti samhliða prófunar á sýnatökutíma, t.d. með því að þyrlla setinu upp með yfirliggjandi vatni og dreifa innihaldinu úr hverju íláti samhliða prófunar á grunnan bakka og taka ormana upp með mjúkri töng úr stáli. Þeir eru skolaðir snögg með vatni í grunnum bakka úr gleri eða stáli. Umframvatn er fjarlægt. Ormarnir eru fluttir varlega í forvigtað ílát og vegnir. Ormarnir eru aflífaðir með frystingu (t.d. ≤ -18 °C). Skrá skal hvort púpuhýði er til staðar, fjölda þeirra og/eða ungvíði.

60. Almennt séð skal vigta orma og aflifa þá tafarlaust eftir sýnatöku án þarmatæmingarfasa til að fá hóflegan stuðul fyrir uppsöfnun í lífverum, sem nær yfir mengað þarmainnihald, og forðast tap á leifum í skrokknum við þarmatæmingartímabil í vatni eingöngu (8. heimild). Ekki er búið við að efni með log K_{ow} yfir 5 eyðist verulega á þarmatæmingartímabili í vatni eingöngu en efni með log K_{ow} undir 4 geta tapast í verulegu magni (47. heimild).
61. Meðan á útskilnaðarfasanum stendur tæma ormarnir þarmana í hreinu seti. Þetta merkir að mælingar rétt fyrir útskilnaðarfasanum ná yfir mengað set í þörmum en búið er við að eftir fyrstu 4–24 klukkustundirnar af útskilnaðarfasanum hafi mestöllu mengaða þarmainnihaldinu verið skipt út fyrir hreint set (11. og 47. heimild). Þá má líta á styrkinn í ormunum í þessu sýni sem styrk í vef eftir þarmatæmingu. Til að gera grein fyrir þynningu á styrk prófunarefnisins með ómengduðu seti meðan á útskilnaðarfasanum stendur er hægt að áætla þyngd þarmainnihaldsins sem hlutfallið á milli blautþyngdar orms/öskuþyngdar orms eða þurrvigtar orms/öskuþyngdar orms.
62. Ef tilgangurinn með tiltekinni rannsókn er að mæla lífaðgengi og raunverulegar leifar í vef prófunarlífvera skal vega a.m.k. undirsýni af meðhöndluðum dýrum (t.d. úr þremur ílátum samhliða prófunar til viðbótar), helst tekin í stöðugu ástandi, hreinsa þau í hreinu vatni í 6 klst. (47. heimild) og vega þau aftur fyrir greiningu. Þá er hægt að bera gögn um þyngd og styrk í líkama orma í þessu undirsýni saman við gildi sem fást úr ornum sem ekki hafa tæmt þarmana. Ormar, sem eru valdir til mælinga m.t.t. útskilnaðar, skulu ekki látnir tæma þarmana áður en þeir eru fluttir í hreint set til að lágmarka viðbótarstreitu fyrir dýrin.
63. Helst skal greina vatns-, set- og ormasýnin strax eftir fjarlægingu (þ.e. innan eins til tveggja daga) til að koma í veg fyrir niðurbrot eða annað tap og til að reikna út áætlaðan upptöku- og útskilnaðarhraða eftir því sem prófuninni miðar. Ef efnagreiningar eru gerðar þegar í stað er einnig unnt að uppgötva strax þegar sléttu er náð.
64. Ef greining er ekki gerð strax skal geyma öll sýni við viðeigandi skilyrði. Afla skal upplýsinga um stöðugleika og viðeigandi geymsluskilyrði fyrir tiltekið prófunarefni áður en rannsóknin hefst (t.d. tímalengd og hitastig geymslu, útdráttaraðferðir o.s.frv.). Ef slíkar upplýsingar liggja ekki fyrir og eru taldar nauðsynlegar er hægt að keyra samtímis samanburð með íbættum vef til að ákvarða stöðugleika við geymslu.

Gæði efnagreiningaraðferðar

65. Þar eð öll aðferðin ræðst í meginatriðum af nákvæmni, samkvæmni og næmi þeirrar greiningaraðferðar sem er notuð fyrir prófunarefnið skal kanna með tilraunum hvort samkvæmni og samanburðarnákvæmni efnagreiningarinnar, svo og endurheimt prófunarefnisins úr vatns-, set- og ormasýnum séu fullnægjandi að því er varðar viðkomandi aðferð. Einnig skal ganga úr skugga um að prófunarefnið sé ógreinanlegt í samanburðarlátum í styrk sem er hærri en bakgrunnsgildin. Ef nauðsyn krefur skal leiðrétt gildi C_w , C_s og C_a fyrir endurheimt og bakgrunnsgildi samanburðarins. Öll sýni skulu meðhöndluð þannig meðan prófunin stendur yfir að mengun og tap séu í lágmarki (t.d. sem stafar af ásogi prófunarefnisins á sýnatökubúnaðinn).
66. Skrá skal og greina frá heildarendurheimt og endurheimt prófunarefnis í ornum, seti, vatni og, ef þær eru notaðar, í gildrum sem innihalda íseyg efni til að halda eftir uppgufuðu prófunarefni.
67. Þar eð mælt er með notkun á geislamerktum efnum er mögulegt að gera greiningu m.t.t. heildargeislavirkni (þ.e. móður- og niðurbrotsefni). Ef greining er möguleg getur þó magnákvörðun á upprunalegu móðurefni og niðurbrotsefnum í stöðugu ástandi eða við lok upptökufasans gefið mikilvægar upplýsingar. Ef ætlunin er að framkvæma slíkar mælingar skal nota viðeigandi útdráttaraðferðir á sýnin þannig að hægt sé að magngreina móðurefnið sérstaklega. Ef niðurbrotsefni sem greinist er verulegur hundradshluti (t.d. > 10%) af geislavirkninni sem mælist í prófunarlífverunni í stöðugu ástandi eða við lok upptökufasans er mælt með því að sanngreina slík niðurbrotsefni (5. heimild).

68. Vegna lítills lífmassa hjá hverjum ormi er oft ekki mögulegt að ákvarða styrk prófunarefnis í hverjum ormi fyrir sig nema *Branchiura sowerbyi* (40–50 mg blautvigt, hver ormur) sé notuð sem prófunartegund (11. heimild). Þess vegna er ásætlanlegt að hópa einstaka sýni, sem eru tekin úr tilteknu prófunariláti, en það takmarkar þær tölfraðiaðferðir sem hægt er að nota á gögnin. Ef tiltekin, tölfraðileg aðferð og tölfraðileg vissa skipta miklu máli skal prófunin ná til nægilega margra tilraunadýra og/eða íláta samhliða prófunar þannig að hún samrýmst þeirri hópun, aðferð og tölfraðilegu vissu sem sóst er eftir.
69. Mælt er með því að stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum sé bæði gefinn upp sem fall af heildarblautvigt, heildarþurrvigt og, ef þörf krefur, (t.d. fyrir mjög fitusækin efni) sem fall af fituefnainnihaldinu og heildarmagni lífræns kolefnis í setinu. Nota skal viðeigandi aðferðir til að ákvarða fituefnainnihald (48.–49. heimild). Mæla má með því að útdráttur með klóróformi/metanóli (50. heimild) sé staðalaðferð (48. heimild). Til að komast hjá notkun á klórúðum leysum er þó hægt að nota hringprófað afbrigði af aðferð Bligh og Dyers (50. heimild) eins og lýst er í (51. heimild). Þar eð mismunandi aðferðir gefa ekki sömu gildi (48. heimild) er mikilvægt að lýsa nákvæmlega þeirri aðferð sem er notuð. Ef unnt er, þ.e. ef nægilegur ormavefur er fyrir hendi, skal mæla fituefnainnihald í sama sýni eða útdrætti og þeim sem er notaður í greiningunni á prófunarefninu því það þarf oft að fjarlægja fituefni úr útdrættinum áður en hægt er að greina hann með litskiljun (5. heimild). Þó er hagkvæmt að nota aðlöguð samanburðarýr, a.m.k. við upphaf eða helst við lok upptökufasans, til að mæla fituefnainnihaldið, t.d. í þremur sýnum.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

70. Upptökuferill prófunarefnisins fæst með því að teikna feril á línulegum kvarða sem sýnir styrk þess í/á ormunum meðan á upptökufasanum stendur sem fall af tíma. Ef ferillinn hefur náð sléttu er stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum í stöðugu ástandi (BAF_{ss}) reiknaður út

$$C_a \text{ í stöðugu ástandi eða á 28. degi (meðaltal)}$$

$$C_s \text{ í stöðugu ástandi eða á 28. degi (meðaltal)}$$

71. Stuðull fyrir hraða uppsöfnunar í lífverum (BAF_K) er ákvarðaður sem hlutfall k_s/k_c . Fasti fyrir útskilnað (k_c) er yfirleitt ákvarðaður út frá útskilnaðarferlinum (þ.e. ferill styrks prófunarefnisins í ormunum meðan á útskilnaðarfasanum stendur). Fasti fyrir upptökuhraða k_s er síðan reiknaður út frá ferli upptökuhraðans. Ákjósanlegasta aðferðin til að reikna stuðul fyrir hraða uppsöfnunar í lífverum (BAF_K) og hraðafastana, k_s og k_c , er að nota ólínulegar aðferðir til að meta þessa þætti í tölvu (sjá 2. viðbæti). Ef augljóst er að útskilnaðurinn er ekki af fyrstu gráðu skal nota flóknari líkön (25., 27. og 52. heimild).
72. Stuðull fyrir uppsöfnun í lifríki og seti ($BSAF$) er ákvarðaður með því að staðla stuðul fyrir hraða uppsöfnunar í lífverum (BAF_K) fyrir fituefnainnihald orma og heildarmagn lífræns kolefnis í seti.

Túlkun niðurstaðna

73. Niðurstöðurnar skulu túlkaðar með varúð ef mældur styrkur prófunarstyrkleika er nálægt greiningarmörkum greiningaraðferðarinnar sem notuð er.
74. Vel skilgreindir ferlar fyrir upptöku og útskilnað eru vísbending um að gögnin fyrir uppsöfnun í lífverum séu traust. Almennt séð skulu öryggismörk fyrir gildi stuðuls fyrir uppsöfnun í lífverum úr vel hönnuðum rannsóknum ekki fara yfir 25% (5. heimild).

Prófunarskýrsla

75. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni

- eðliseiginleiki og eðlisefnafræðilegir eiginleikar, t.d. log K_{ow} , vatnsleysni,
- efnafræðileg sanngreiningargögn; uppruni prófunarefnisins, auðkenni og styrkur allra leysa sem eru notaðir,
- ef efnið er geislamerkt, nákvæm staðsetning merktu frumeindanna, sértæk geislavirkni og hve stór hundradshluti geislavirkinnar tengist óhreinindum.

Prófunartegund

- vísindaheiti, stofn, uppruni, hvers kyns formeðhöndlun, aðlögun, aldur, stærðarflokkur o.s.frv.

Prófunarskilyrði

- prófunaraðferð sem er notuð (t.d. kyrrstöðu-, hálfkyrrstöðuprófun eða gegnumstreymi),
- tegund og einkenni þeirrar lýsingar sem er notuð og ljóslota eða ljóslotur,
- tilhögun prófunar (t.d. fjöldi, efni og stærð prófunaríláta, rúmmál vatns, setmassi og -rúmmál, hve hratt er skipt um vatn (að því er varðar aðferðir með gegnumstreymi eða hálfkyrrstöðu), hvers kyns loftun sem er notuð fyrir prófunina og á meðan á henni stendur, fjöldi íláta fyrir samhliða prófanir, fjöldi orma á hvert ílát samhliða prófana, fjöldi prófunarstyrkleika, lengd upptöku- og útskilnaðarfasa, tíðni sýnatöku),
- aðferð við tilreiðslu prófunarefnis og notkun sem og ástæður fyrir því að velja sérstaka aðferð,
- nafnstyrkleikar í prófuninni,
- uppruni innihaldsefna í tilbúnu vatni og seti eða, ef náttúrulegur miðill er notaður, uppruni vatnsins og setsins, lýsing á hvers kyns formeðhöndlun, niðurstöður úr tilraunum sem eru gerðar til að sýna fram á hæfni tilraunadyranna til að lifa og/eða æxlast í miðlinum sem er notaður, eiginleikar sets (sýrustig og ammoníak í gropuvatninu (náttúrulegu seti), heildarmagn lífræns kolefnis (dreifing kornastærðar (hundraðshlutfall af sandi, silti og leir), hlutfall vatnsinnihalds og allar aðrar mælingar sem gerðar eru) og eiginleikar vatns (sýrustig, harka, eðlisleiðni, hitastig, styrkur uppleysts súrefnis, styrkur klórleifa (ef hann er mældur) og allar aðrar mælingar sem gerðar eru),
- nafnþyngd og mæld þurrvignt í % af blautvignt (eða hlutfall milli þurr- og blautvigtar) gervisetsins; mæld þurrvignt í % af blautvignt (eða hlutfall milli þurr- og blautvigtar) sets af vettvangi,
- vatnsgæði í prófunarílatinu sem einkennast af hitastigi, sýrustigi, ammóníumi, heildarhörku og styrk uppleysts súrefnis,
- nákvæmar upplýsingar um meðhöndlun vatns-, set- og ormasýna, þ.m.t. upplýsingar um tilreiðslu, geymslu, íbættingaraðferðir, útdrátt og greiningaraðferðir (og nákvæmni) varðandi prófunarefnið og fituefnainnihald og endurheimt prófunarefnisins.

Niðurstöður

- dánartíðni samanburðarorma og orma í hverju prófunarílati og öll nær banvæn áhrif sem sjást, þ.m.t. óeðlilegt atferli (t.d. að forðast setið, saurkúlur til staðar eða ekki, engin æxlun),
- mæld þurrvignt í % af blautvignt (eða hlutfall milli þurr- og blautvigtar) setsins og prófunarlífveranna (gagnlegt fyrir stöðlun),
- fituefnainnihald ormana,
- ferlar sem sýna upptöku- og útskilnaðarhraða prófunarefnisins í ormunum og tímann að stöðugu ástandi,
- C_a , C_s og C_w (með staðalfrávikum og styrkbili, ef við á) fyrir alla sýnatökutíma (C_a gefið upp í $g\ kg^{-1}$ blaut- og þurrvignt alls skrokksins, C_s gefið upp í $g\ kg^{-1}$ af blaut- og þurrvignt sets og C_w í $mg\ l^{-1}$). Ef stuðuls fyrir uppsöfnun í lífríki og seti (BSAF) er krafist (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti) (t.d. til að bera saman niðurstöður úr tveimur eða fleiri prófunum sem voru framkvæmdar á dýrum með mismunandi fituefnainnihald) skal þar að auki gefa C_a upp sem $g\ kg^{-1}$ af fituefnainnihaldi lífverunnar og C_s skal gefa upp sem $g\ kg^{-1}$ af lífrænu kolefni (OC) í setinu,

- gera má sérstaklega grein fyrir stuðli fyrir uppsöfnun í lífverum (gefinn upp sem kg af blautu seti á kg^{-1} af blautum ormi), fasta fyrir upptökuhraða sets k_s (gefinn upp sem g af blautu seti á kg^{-1} blautum ormi d^{-1}) og fasta fyrir útskilnaðarhraða k_e (gefinn upp sem d^{-1}); stuðli fyrir uppsöfnun í lífríki og seti (gefinn upp sem kg af lífrænu kolefni í setinu á kg^{-1} af fituefnainnihaldi orma),
- leifar sem ekki eru fjarlægðar við lok útskilnaðarfasans,
- ef það er mælt: hundraðshluti móðurefnis, niðurbrotsefna og bundinna efnaleifa (þ.e. hlutfall prófunarefnis sem ekki er hægt að draga út með algengum útdráttaraðferðum) sem greinast í tilraunadýrum,
- aðferðir sem notaðar eru við tölfraðilegar greiningar á gögnunum.

Mat á niðurstöðum

- fylgni niðurstaðna við gildisviðmiðanir sem eru tilgreindar í 21. lið,
- óvæntar eða óvenjulegar niðurstöður, t.d. prófunarefnið hverfur ekki fullkomlega úr tilraunadýrunum; í slíkum tilvikum geta niðurstöður úr hvers kyns forrannsókn veitt gagnlegar upplýsingar.

*I. viðbætur***Skilgreiningar og einingar**

Gerviset eða samsett set, endurgert set eða tilbúið set er blanda efna sem er notuð til að líkja eftir eðlisrænum efnisþáttum náttúrulegs sets.

Uppsöfnun í lífverum er aukning á styrk prófunarefnis í eða á lífveru í hlutfalli við styrk prófunarefnisins í umhverfi hennar. Uppsöfnun í lífverum stafar bæði af lífþéttni- og lífmögnunarferlum (sjá hér á eftir).

Stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum á hverjum tímapunkti í upptökufasa þessarar prófunar á uppsöfnun í lífverum er styrkur prófunarefnis í eða á prófunarlífverunni (C_a í g á kg^{-1} af blaut- eða þurrvigti) deilt með styrk efnisins í umhverfi hennar (C_s sem g á kg^{-1} af blaut- eða þurrvigti sets). Við vísun til eininganna C_a og C_s er stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum með einingarnar kg set kg^{-1} ormar (15. heimild).

Stuðlar fyrir uppsöfnun í lífverum sem eru reiknaðir út beint frá hlutfallinu á milli fasta fyrir upptökumhraða úr seti deilt með fasta fyrir útskilnaðarhraða (k_s og k_e , eftir því sem við á, sjá hér á eftir) eru nefndir stuðlar fyrir hraða uppsöfnunar í lífverum (BAF_k).

Lífþéttni er aukning á styrk prófunarefnis í eða á lífveru, sem stafar eingöngu frá upptöku um yfirborð líkamans, í hlutfalli við styrk prófunarefnisins í umhverfi hennar.

Lífmögnun er aukning á styrk prófunarefnis í eða á lífveru, sem stafar aðallega af upptöku úr menguðu fódri eða bráð, í hlutfalli við styrk prófunarefnisins í fódri eða bráðinni. Lífmögnun getur leitt til tilfærslu eða uppsöfnunar á prófunarefninu í fæðuvefjum.

Stuðull fyrir uppsöfnun í lífríki og seti (BSAF) fæst með deilingu í staðlaðan styrk prófunarefnisins fyrir fituefnainnhald í/á prófunarlífverunni með styrk prófunarefnisins fyrir lífrænt kolefni í setinu við stöðugt ástand. Síðan er C_a gefið upp sem g á kg^{-1} af fituefnainnihaldi lífverunnar og C_s sem g á kg^{-1} af lífrænu innihaldi setsins.

Undirbúningstímabil er notað til að stöðga örveruefnisþætti setsins og fjarlægja t.d. ammoníak sem er upprunnið í efnisþáttum setsins; þetta á sér stað áður en prófunarefninu er bætt í setið. Yfirliggjandi vatni er yfirleitt fleygt eftir undirbúning.

Útskilnaður prófunarefnis er tap þessa efnis úr vef prófunarlífverunnar með virkum eða óvirkum ferlum sem eiga sér stað óháð því hvort prófunarefnið er fyrir hendi í umhverfi hennar eða ekki.

Útskilnaðarfasi er sá tími, eftir að prófunarlífverur hafa verið fluttar úr menguðum miðli í miðil sem er laus við prófunarefnið, þegar útskilnaður (eða hreint tap) efnisins úr prófunarlífverunum er rannsakaður.

Fasti fyrir útskilnaðarhraða (k_e) er tölugildi sem skilgreinir hraða lækkunar á styrk prófunarefnisins í/á prófunarlífverunni eftir að prófunarlífverurnar hafa verið fluttar úr miðli sem inniheldur prófunarefnið yfir í miðil sem er laus við íðefnið; k_e er gefið upp sem d^{-1} .

Jafnvægistími er notaður til að gera ráð fyrir dreifingu prófunarefnisins milli fasta fasans, gropuvatnsins og yfirliggjandi vatnsins; hann á sér stað eftir að prófunarefninu er bætt í setið og áður en prófunarlífverunum er bætt við.

Deilistuðull fyrir oktanól og vatn (K_{ow}) er hlutfallið á milli leysni efnis í n-oktanóli og vatni við jafnvægi, stundum einnig gefið upp sem P_{ow} . Logri K_{ow} ($\log K_{ow}$) er notaður sem vísbending um getu efnis til að safnast upp í lagarlífverum.

Deilistuðull fyrir lífrænt kolefni og vatn (K_{oc}) er hlutfallið á milli styrks efnis í/á lífrænum kolefnishluta í seti og styrks efnisins í vatni við jafnvægi.

Yfirliggjandi vatn er vatnið sem liggur yfir setinu í prófunarlátinu.

Slétta eða stöðugt ástand er skilgreint sem jafnvægi milli upptöku- og útskilnaðarferla sem eiga sér stað samtímis meðan á váhrifafasanum stendur. Stöðugt ástand sést í ferlinum fyrir stuðul fyrir uppsöfnun í lífverum á hverju sýnatökutímabili á móti tíma, þegar ferillinn verður samsíða tímaásnum og þrjár mælingar í röð á stuðli fyrir uppsöfnun í lífverum í sýnum, sem eru teknar með a.m.k. tveggja daga millibili, gefa niðurstöður þar sem munur milli mælinga er innan við 20% og enginn tölfræðilegur, marktækur munur er á sýnatökutímabilunum þremur. Ef upptaka prófunarefna er hægt eru sjö dagar hæfilegra millibil (5. heimild).

Gropuvatn eða millivatn er vatnið í rýminu milli sets- eða jarðvegsagna.

Fasti fyrir upptökuhraða í jarðvegi (k_s) er tölugildi sem skilgreinir hraða aukningar á styrk prófunarefnisins í/á prófunarlífverunni, sem stafar af upptöku í setfasanum; k_s er gefið upp sem g set kg^{-1} ormur d^{-1} .

Íbætt set er set sem prófunarefni hefur verið bætt í.

Stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum í stöðugu ástandi (BAF_{ss}) er stuðull fyrir uppsöfnun í lífverum í stöðugu ástandi og breytist ekki verulega í langan tíma, styrkur prófunarefnisins í umhverfinu (C_s sem g kg^{-1} af blautvigt eða þurrvigt sets er stöðugur á tímabilinu.

Upptöku- eða váhrifafasi er sá tími sem prófunarlífverurnar verða fyrir váhrifum af prófunarefninu.

2. viðbætur

Útreikningur á mælipáttum fyrir upptöku og útskilnað

Helsti endapunktur prófunar á uppsöfnun í lifverum er stuðullinn fyrir uppsöfnun í lifverum (BAF). Hægt er að reikna mældan stuðul fyrir uppsöfnun í lifverum út með því að deila í styrkinn í prófunarlifverunni, C_a , með styrk prófunarefnisins í setinu, C_s , við stöðugt ástand. Ef stöðugt ástand næst ekki meðan á upptökufasanum stendur er stuðull fyrir uppsöfnun í lifverum reiknaður út á sama hátt fyrir dag 28. Þó skal skrá hvort stuðull fyrir uppsöfnun í lifverum byggist á styrk í stöðugu ástandi eða ekki.

Æskilegasta aðferðin við að fá fram stuðul fyrir hraða uppsöfnunar í lifverum (BAF_K), fasta fyrir upptökumhraða í seti (k_s) og fasta fyrir útskilnaðarhraða (k_e) er að nota ólínulegar aðferðir til að meta þessa þætti í tölvu. Ef notuð er tímaröð meðaluppsöfnunarstuðla (C_a , meðalgildi fyrir hverja sýnatökudagsetningu/ C_s , meðalgildi fyrir hverja sýnatökudagsetningu = AF) í upptökufasanum, byggt á blautvigt orma og sets, og líkanjafnan

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{-k_e \times t}) \quad 1. \text{ jafna}$$

þar sem AF(t) er hlutfall styrks prófunarefnis í ormum og styrkur þess í seti á tilteknum tímamarki (t) í upptökufasanum, reikna þessi tölvuforrit út gildi fyrir stuðul fyrir hraða uppsöfnunar í lifverum (BAF_K), k_s og k_e .

Ef stöðugt ástand næst meðan á upptökufasanum stendur (þ.e. = ∞) er hægt að smækka jöfnu 1 í:

$$BAF_K \frac{k_s}{k_e} \quad 2. \text{ jafna}$$

þar sem

k_s = fasti fyrir upptökumhraða í vef (g set kg^{-1} ormur d^{-1})

k_e = fasti fyrir útskilnaðarhraða (d^{-1})

Þá er $k_s/k_e \times C_s$ nálgun á styrk prófunarefnisins í ormavefnum við stöðugt ástand ($C_{a,ss}$).

Reikna skal stuðul fyrir uppsöfnun í lífríki og seti (BSAF) sem hér segir:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

þar sem f_{oc} er þáttur lífræns kolefnis í seti og f_{lip} er þáttur fituinnihalds í ormum, báðir annað hvort byggðir á þurrvigt eða blautvigt.

Ef notuð er tímaröð fyrir styrkgildi er hægt að líkja eftir útskilnaðarhraða með því að nota eftirfarandi líkanjöfnur og útreikning í tölvu, byggðan á ólínulegri aðferð til að áætla þessa þætti.

Mælt er með að meðaltal af mældum leifum í líkamanum við lok upptökufasans sé sjálfgefinn upphafspunktur. Einungis skal nota gildið sem líkt var eftir/áætlað var út frá upptökufasanum ef t.d. mælt gildi vikur umtalsvert frá gildi leifanna í líkama sem kom fram í líkaninu. Sjá einnig 50. lið um þann valkost að ormar, sem voru valdir til sýnatöku í útskilnaðarfasanum, séu áður látnir verða fyrir váhrifum; með þessari aðferð er talið að sýni af þessum ormum, sem eru áður látnir verða fyrir váhrifum, frá degi 0 í útskilnaðarfasanum séu með raunhæfar leifar í líkamanum til að hefja útskilnaðarhraðann með.

Ef gagnapunktur, sem er eru teiknaðir sem fall af tíma, sýna stöðuga veldislækkun á styrk prófunarefnisins í dýrunum er hægt að nota eins hólfis líkan (jafna 4) til að lýsa tímarás útskilnaðarins.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_{et}} \quad 3. \text{ jafna}$$

Útskilnaðarferlar virðast stundum vera tvífasa, sýna hraða lækkun á C_a í fyrri fösunum sem breytist í hægara tap á prófunarefnum í síðari fösunum útskilnaðarins, (8., 19. og 25. heimild). Hægt er að túlka þessa tvo fasa út frá þeirri forsendu að þetta séu tvö mismunandi hólf í lífverunni og prófunarefnið tapist úr þeim á mismunandi hraða. Í þessum tilvikum skal rannsaka tilteknar heimildir (15.–17. og 25. heimild).

Tveggja hólfu útskilnaði er t.d. lýst með eftirfarandi jöfnu (25. heimild):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \quad 4. \text{ jafna}$$

A og B eru stærð hólfanna (hundraðshlutfall af heildarleifum í vef) þar sem A er hólfíð þaðan sem efnið tapast hratt og B er hólfíð þaðan sem efnið tapast hægt. Summan af A og B jafngildir 100% af hólfarúmmáli alls dýrsins við stöðugt ástand. k_a og k_b eru samsvarandi fastar fyrir útskilnað (d^{-1}). Ef líkanið fyrir hólfín tvö er lagað að hreinsunargögnunum er hægt að ákvarða fasta fyrir upptökuhraða k_s sem hér segir (53.–54. heimild):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times \text{BAF}}{A + B} \quad 5. \text{ jafna}$$

Engu að síður skal nota þessar líkanjöfnur af varkárni, einkum þegar breytingar verða á lífaðgengi prófunarefnisins meðan á prófuninni stendur (42. heimild).

Í stað þess að nota líkanjöfnurnar sem lýst er hér að framan er einnig hægt að reikna út hraðamæliþættina (k_s og k_c) í einni keyrslu með því að nota hraðalíkan af fyrstu gráðu á öll gögn, bæði úr upptöku- og útskilnaðarfasanum, saman. Að því er varðar lýsingu á aðferð sem gerir það kleift að framkvæma slíka sameinaða útreikninga á fasta fyrir upptöku- og útskilnaðarhraða er hægt að fletta upp í 55., 56. og 57. heimild.

Leifar sem ekki eru fjarlægðar (NER) skal reikna út sem aukaendapunktur með því að margfalda hlutfall meðalstyrks í ormunum (C_a) á 10. degi útskilnaðarfasans og meðalstyrk í ormunum (C_a) við stöðugt ástand (28. dagur upptökufasans) með 100:

$$NER_{10d} [\%] = \frac{C_a \text{ við lok útskilnaðar (meðaltal)} \times 100}{C_a \text{ við stöðugt ástand (meðaltal)}}$$

3. viðbætur

Dæmi um sýnatökuáætlun fyrir prófun á uppsöfnun í lífverum í 28 daga

a) Upptökufasi (þ.m.t. 4. daga jafnvægisfasi)

Dagur	Aðgerðir
-6	Tilreiðsla á mósvíflausn fyrir set; svíflausnin er undirbúin í 48 klst.
-4	Íbæting í setið eða hluta af setinu; blöndun á öllum efnisþáttum setsins; sýni úr meðhöndluðu seti og seti í samanburði með leysi eru tekin til að ákvarða styrk prófunarefnis; yfirliggjandi vatni bætt við; látið standa við prófunarskilyrði (jafnvægisfasi).
-3/-2	Prófunarlífverurnar teknar úr ræktinni til aðlögunar.
0	Mælingar á vatnsgæðum (sjá 52. lið); samhliða prófanir eru fjarlægðar til að taka sýni úr vatni og seti til að ákvarða styrk prófunarefnis; ornum dreift af handahófi í prófunarilátin; nægum undirsýnum af ornum haldið eftir til að ákvarða bakgrunnsgreiningargildi; loftbirgðum stjórnað ef lokuð prófunarkerfi eru notuð.
1	Samhliða sýni eru fjarlægð til sýnatöku; loftbirgðum stjórnað, atferli orma, vatnsgæði (sjá 56. lið); tekin sýni úr vatni, seti og ornum til að ákvarða styrk prófunarefnis.
2	Loftbirgðum stjórnað, atferli orma og hitastig skráð.
3	Eins og dagur 1.
4-6	Eins og dagur 2.
7	Eins og dagur 1, ef þörf krefur er vatni bætt við í staðinn fyrir vatn sem gufar upp.
8-13	Eins og dagur 2.
14	Eins og dagur 1, ef þörf krefur er vatni bætt við í staðinn fyrir vatn sem gufar upp.
15-20	Eins og dagur 2.
21	Eins og dagur 1, ef þörf krefur er vatni bætt við í staðinn fyrir vatn sem gufar upp.
22-27	Eins og dagur 2.
28	Eins og dagur 1; mælingar á vatnsgæðum (sjá 52. lið); lok upptökufasans; nægum undirsýnum af ornum haldið eftir til að ákvarða bakgrunnsgreiningargildi; blaut- og þurrvig og fituefnainnihald; ormar fluttir úr váhrifailátum sem eftir eru í ílát sem innihalda hreint set fyrir útskilnaðarfasann (engin þarmatæming); tekin sýni úr vatni, seti og ornum úr samanburðarílátum; tekin sýni úr gildrum ef þeim var komið fyrir.
	Raða skal aðgerðum sem eiga sér stað fyrir váhrifin (jafnvægisfasi) niður með tilliti til eiginleika prófunarefnisins. Ef þörf krefur er tilreidda setið undirbúið, undir yfirliggjandi vatninu, við 20 ± 2 °C í 7 daga; í þessu tilvik er setið tilreitt fyrirfram!
	Aðgerðir, sem lýst er fyrir dag 2, skal framkvæma daglega (a.m.k. á virkum dögum).

b) Útskilnaðarfasi

Dagur	Aðgerðir
-6	Tilreiðsla á mósvisflausn fyrir set; sviflausnin er undirbúin í 48 klst.
-4	Blöndun á öllum efnispáttum setsins; sýni úr meðhöndluðu seti og seti í samanburði með leysi eru tekin til að ákvarða styrk prófunarefnis; yfirliggjandi vatni bætt við; látið standa við prófunarskilyrði.
0 (28. dagur upptökufasa)	Mælingar á vatnsgæðum (sjá 52. lið); ormar fluttir úr ílátum samhliða prófana sem eftir eru í ílát sem innihalda hreint set; eftir 4–6 klst. eru ílát samhliða prófana fjarlægð til að taka sýni úr vatni, seti og ormum til að ákvarða styrk prófunarefnisins; ormum dreift af handahófi í prófunarílatin.
1	Samhliða sýni eru fjarlægð til sýnatöku; loftbirgðum stjórnað, atferli orma, vatnsgæði (sjá 52. lið); tekin sýni úr vatni, seti og ormum til að ákvarða styrk prófunarefnis.
2	Loftbirgðum stjórnað, atferli orma og hitastig skráð.
3	Eins og dagur 1.
4	Eins og dagur 2.
5	Eins og dagur 1.
6	Eins og dagur 2.
7	Eins og dagur 1, ef þörf krefur er vatni bætt við í staðinn fyrir vatn sem gufar upp.
8–9	Eins og dagur 2.
10	Eins og dagur 1; lok útskilnaðarfásans, mælingar á vatnsgæðum (sjá 52. lið); tekin sýni úr vatni, seti og ormum í samanburði með leysi; tekin sýni úr gildrum ef þeim var komið fyrir.
	Tilreiðsla sets áður en útskilnaðarfásinn hefst skal vera á sama hátt og fyrir upptökufasann.
	Aðgerðir, sem lýst er fyrir dag 2, skal framkvæma daglega (a.m.k. á virkum dögum).

4. viðbætur

Nokkrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar viðunandi þynningarvatns

INNIHALDSEFNI	STYRKLEIKAR
Efnisagnir	< 20 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	< 2µg/l
Ójónað ammoníak	< 1 µg/l
Klórleifar	< 10 µg/l
Heildarstyrkur fosfórlífrænna varnarefna	< 50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjöklóruðum bifénylum	< 50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	< 25 ng/l

SAMSETNING ENDURGERÐA VATNSINS SEM MÆLT ER MEÐ

a) Kalsíumklóríðlausn

Leysið upp 11,76 g af $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ í afjónuðu vatni; fyllið upp að 1 l með afjónuðu vatni

b) Magnesíumsúlfatlausn

Leysið upp 4,93 g af $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ í afjónuðu vatni; fyllið upp að 1 l með afjónuðu vatni

c) Natríumbíkarbónatlausn

Leysið upp 2,59 g af NaHCO_3 í afjónuðu vatni; fyllið upp að 1 l með afjónuðu vatni

d) Kalíumklóríðlausn

Leysið upp 0,23 g af KCl í afjónuðu vatni; fyllið upp að 1 l með afjónuðu vatni

Öll iðefni verða að vera af greiningarhreinleika.

Eðlisleiðni eimaða eða afjónaða vatnsins skal ekki fara yfir $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Blandið 25 ml af hverri af lausnunum í a- til d-lið saman og fyllið með afjónuðu vatni upp að heildarmagninu 1 l. Summa kalsíum- og magnesíumjóna í þessari lausn er 2,5 mmól á lítra.

Hlutfall kalsíumjóna á móti magnesíumjónum er 4:1 og natríumjóna á móti kalíumjónum 10:1. Sýrurým $\text{K}_{\text{S4.3}}$ í þessari lausn er 0,8 mmól á lítra.

Loftið þynningarvatnið þar til súrefnismettun er náð, geymið síðan í u.þ.b. tvo daga án frekari loftunar fyrir notkun.

pH-gildi viðunandi þynningarvatns skal vera á bilinu 6–9.

5. viðbætur

Gerviset – ráðleggingar um tilreiðslu og geymslu

Ólíkt kröfunum í prófunaraðferð C.8 (40. heimild) er mælt með því að móinnihald gervisets sé 2% í stað 10% af þurrvigti til að svara til lítils magns eða miðlungsmagns af lífrænu efni í náttúrulegu seti (58. heimild).

Hundraðshluti þurra innihaldsefna í gervisetinu:

Innihaldsefni	Eiginleikar	% af þurru seti
Mór	Barnamosamór, niðurbrotstyg: „í meðallagi“, loftþurrkaður, engar sýnilegar plöntuleifar, fínmalaður (kornastærð $\leq 0,5$ mm)	$2 \pm 0,5$
Kvarssandur	Kornastærð: ≤ 2 mm en $> 50\%$ af ögnunum skal vera á bilinu 50–200 μm	76
Kaólínitleir	Kaólínítinnihald $\geq 30\%$	22 ± 1
Fóðurgjafi	<i>Folia urticae</i> , lauf í duftformi af <i>Urtica sp.</i> (brenninetla), fínmöluð (kornastærð $\leq 0,5$ mm) eða blanda af laufi í duftformi af <i>Urtica sp.</i> með alfa-sellulósa (1:1); í samræmi við lyfjafræðistaðla, til manneldis; til viðbótar við þurrt set	0,4–0,5%
Kalsíumkarbónat	CaCO_3 , malað í duft, af efnafræðilegum hreinleika, til viðbótar við þurrt set	0,05–1
Afjónað vatn	Eðlisleiðni $\leq 10 \mu\text{S/cm}$, til viðbótar við þurrt set	30–50

Ef búist er við hækkuðum styrk ammoníaks, t.d. ef vitað er að prófunarefnið hamlar nitrú, getur verið gagnlegt að skipta 50% af köfnunarefnisauðugu netludufti út fyrir sellulósa (t.d. alfa-sellulósaduft, af efnafræðilegum hreinleika, kornastærð $\leq 0,5$ mm).

Tilreiðsla

Mórin er loftþurrkaður og malaður í fínt duft (kornastærð $\leq 0,5$ mm, engar sýnilegar plöntuleifar). Sviflausn með tilskildu magni af módufti er tilreidd með skammti af afjónaða vatninu sem bætt er við þurra setið (vatnsmagn sem nemur $11,5 \times$ þurrvigti mós hefur reynst vel til að mynda hræranlega mógrugglausn, 8. heimild) með því að nota afkastamikinn búnað til að gera hana einsleita.

pH-gildi þessarar sviflausnar er stillt í $5,5 \pm 0,5$ með CaCO_3 . Sviflausnin er undirbúin í a.m.k. tvo daga og hrært varlega við 20 ± 2 °C til að stöðga sýrustigið og koma á stöðugum örveruefnisþætti. pH-gildið er mælt aftur og stillt í $6,0 \pm 0,5$ með CaCO_3 ef nauðsyn krefur. Síðan er öll sviflausnin blönduð með öðrum þurrum innihaldsefnum að teknu tilliti til allra hluta sem eru notaðir til íbætingar. Afjónaða vatninu, sem eftir er, er bætt í til að fá einsleitt set. pH-gildið er mælt aftur og stillt í $6,5$ – $7,5$ með CaCO_3 ef nauðsyn krefur. Ef búist er við ammoníakmyndun getur þó verið gagnlegt að halda pH-gildi setsins undir 7,0 (t.d. á bilinu 6,0–6,5). Tekin eru sýni af setinu til að ákvarða þurrvigti og innihald af lífrænu kolefni. Ef búist er við ammoníakmyndun er hægt að undirbúa gervisetið í sjö daga við sömu skilyrði og verða síðan ríkjandi í prófuninni (t.d. hlutfall sets og vatns 1:4, hæð setlags eins og í prófunarílátunum) áður en prófunarefnið er sett í það, þ.e. það skal fyllt upp með loftuðu vatni. Við lok undirbúningstímabilsins skal fjarlægja yfirliggjandi vatn og fleygja því. Tekin eru sýni af setinu til að ákvarða þurrvigti og heildarmagn lífræns kolefnis (t.d. 3 sýni).

Eftir það er íbættur kvarssandur blandaður með seti fyrir hvert meðhöndlunarstig, setinu dreift í ílát samhliða prófunar og fyllt upp með prófunarvatni (t.d. hlutfall sets og vatns 1:4, hæð setlags eins og í prófunarílátunum) Ílátin eru síðan látin standa við sömu skilyrði og verða síðan ríkjandi í prófuninni sem á eftir fer. Þarna hefst jafnvægistíminn. Lofta skal yfirliggjandi vatn.

Völdum fôðurgjafa skal bætt við áður en prófunarefninu er bætt í setið eða meðan á því stendur. Hægt er að blanda það fyrst með mósviflausn (sjá hér að framan) Þó er hægt að komast hjá óhóflegu niðurbroti fôðurgjafans áður en prófunarlífverunum er bætt í — t.d. ef um er að ræða langan jafnvægistíma — með því að hafa tímann milli þess að fôðri er bætt við og þangað til váhrif hefjast eins stuttan og unnt er. Til að tryggja að fôðrið sé í nægri snertingu við prófunarefnið skal blanda fôðurgjafanum við setið eigi síðar en þann dag sem prófunarefninu er bætt í setið. Heimilt er að gera undantekningar ef lengd jöfnunartímabilsins leiðir til óhóflegs örveruniðurbrots á fôðrinu áður en prófunarlífverunum er bætt í. Tekin eru sýni af setinu til að ákvarða þurrvigt og heildarmagn lífræns kolefnis (t.d. 3 sýni af íbættu seti eða samanburðarseti).

Gera skal grein fyrir þurrvigt efnisþáttanna (mór, sandur, kaólín) í g og í hundraðshlutum af heildarþurrvigt.

Einnig skal gera grein fyrir vatnsmagni, sem bætt er við þurru efnisþættina við tilreiðslu setsins, í hundraðshlutum af heildarþurrvigt (t.d. 100% þurrvigt + 46% vatn merkir að í 1000 g af þurrvigt eru settir alls 460 ml af vatni sem gefur 1460 g af blautu seti).

Geymsla

Geyma má þurr innihaldsefni gervisets á þurrum og svölum stað við stofuhita. Geyma má tilreitt, blautt set (einungis til frekari notkunar í ræktuninni) við 4 ± 2 °C í myrkri í 2–4 vikur frá tilreiðsludegi (8. heimild).

Set með íbættu prófunarefni skal nota tafarlaust nema fyrir liggja upplýsingar um að hægt sé að geyma þetta tiltekna set án þess að það hafi áhrif á eiturrhif og lífaðgengi prófunarefnisins. Sýni af íbættu seti má síðan geyma við þau skilyrði sem mælt er með fyrir viðkomandi prófunarefni þar til greining fer fram.

6. viðbætur

Ánategundir sem mælt er með til prófunar á uppsöfnun í lífverum***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Blóðánarnir (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) búa í ferskvatnsseti í rörum sem eru klædd að innan með slími. Ánarnir liggja í rörunum með hausinn niður, láta ofan í sig setagnir og nýta örverurnar og lífrænu leifarnar í þeim. Yfirleitt gengur afturendinn í bylgjum í yfirliggjandi vatninu til öndunar. Þó að þessi tegund búi í margs konar settegundum um allt norðurhvel jarðar kýs *Tubifex tubifex* helst hlutfallslega litla kornastærð (59. heimild). Hentugleika þessarar tegundar til vísitæturefnafræðilegra prófana er t.d. lýst í 8., 29., 31., 39., 60. og 62.–63. heimild.

Ræktunaraðferðir

Til að hafa nægilegan fjölda af *Tubifex tubifex* til að framkvæma prófanir á uppsöfnun í lífverum þarf að ala ormana í varanlegri rannsóknarstofuræktun. Mælt er með kerfi sem samanstendur af gerviseti, að stofni til úr tilbúnum jarðvegi sem lýst er í prófunaraðferð C.8 (40. heimild), og endurgerðu vatni samkvæmt prófunaraðferð C.1 fyrir ræktun *T. tubifex* (8. heimild).

Hægt er að nota ílát úr gleri eða ryðfríu stáli, 12–20 cm á hæð, sem ræktunarlát. Í hvert ræktunarlát er sett lag af blautu gerviseti sem er tilreitt eins og lýst er í 5. viðbæti. Dýpt setlagsins skal gera ormunum kleift að grafa sig niður eins og þeim er eðlilegt (a.m.k. 2 cm lágmarksdýpt fyrir *T. tubifex*). Endurgerðu vatni er bætt í kerfið. Þess skal gætt að halda röskun á setinu í lágmarki. Vatnshlotið er loftað varlega (t.d. tvær bólur á sekúndu með 0,45 µm-síuðu lofti) með Pasteur-pípettu sem er staðsett 2 cm ofan við yfirborð setsins. Ráðlagður hiti í ræktuninni er 20 ± 2 °C.

Ormunum er bætt í ræktunarkerfið með hámarkshleðslu sem nemur 20000 einstaklingum/m² af yfirborði setsins. Meiri hleðsla getur valdið samdrætti í vexti og æxlunarhraða (43. heimild).

Orma í ræktum í gerviseti þarf að fæða. Fæða sem samanstendur af finmöluðu fiskafóðri, t.d. TetraMin® getur verið viðbótarnæring (8. heimild); Klerks 1994, persónuleg orðsending. Fóðrunarmagnið skal tryggja nægan vöxt og æxlun og halda uppsöfnun ammoníaks og sveppagróðurs í ræktinni í lágmarki. Gefa má fóður tvisvar í viku (t.d. 0,6–0,8 mg á hvern cm² af yfirborði setsins). Fengin reynsla hefur sýnt að ísetning fóðurs sem svifblöndu, sem gerð hefur verið einsleit í afjönuðu vatni, getur auðveldað einsleita dreifingu fóðurs á yfirborði setsins í ræktunarlátunum.

Til að koma í veg fyrir uppsöfnun ammoníaks skal skipta um yfirliggjandi vatn með því að nota gegnumstreymiskerfi eða handvirkt a.m.k. einu sinni í viku. Í stofnræktum skal skipta um set á þriggja mánaða fresti.

Hægt er að taka sýni úr ornum úr ræktinni með því að sigta setið í ræktinni gegnum 1 mm sigti, ef einungis er þörf á fullvöxnum ornum. Til söfnunar á egghylkjum hentar 5,0 mm sigti og fyrir ormaungviði hentar 0,25 mm sigti. Hægt er að setja sigtin í endurgert vatn eftir að setið er farið í gegnum þau. Ormarnir fara úr sigtinu og þá er hægt að tína þá upp úr vatninu með mjúkri töng úr stáli eða pípettu með eldsléttuðum brúnum.

Einungis eru notuð heil og skýrt sanngreind eintök af *Tubifex tubifex* (sjá t.d. 64. heimild) til að hefja prófun eða nýjar ræktanir. Kasta þarf sýktum eða sködduðum ornum sem og egghylkjum sem eru sýkt af sveppþráðum.

Samstillt ræktun getur gefið af sér orma á tilteknum aldri með heppilegu millibili þegar þess er óskað. Ný ræktunarlát eru sett upp með því millibili sem valið er (t.d. á tveggja vikna fresti) og sett af stað með dýrum á tilteknum aldri (t.d. egghylkjum). Við ræktunarskilyrðin sem hér er lýst eru ormarnir fullvaxnir eftir 8–10 vikur. Hægt er að safna úr ræktinni þegar ormarnir hafa losað ný egghylki, t.d. eftir 10 vikur. Hægt er að nota fullvöxnu einstaklingana, sem safnað er, í prófanir og hefja nýjar ræktanir með egghylkjunum.

Blóðmaðkur (*Lumbriculus variegatus* (MÜLLER)), Lumbriculidae, ánar

Blóðmaðkar (*Lumbriculus variegatus*, Lumbriculidae, Oligochaeta), búa einnig í ferskvatnsseti um allan heim og eru mikið notaðir í visteitunefnafræðilegum prófunum. Hægt er að finna upplýsingar um líffræði, ræktunarskilyrði og næmi tegundarinnar í 1., 6., 9. og 36. heimild. Einnig er hægt að rækta blóðmaðka í gervisetinu sem mælt er með fyrir *T. tubifex* skv. 8. heimild, með tilteknum takmörkunum. Þar eð blóðmökkum er eðlislægt að kjósa grófara set en *T. tubifex* (59. heimild) geta rannsóknarstofuræktir með gerviseti, sem notað er fyrir *T. tubifex*, stöðvast eftir 4–6 mánuði. Fengin reynsla hefur sýnt að hægt er að ala blóðmaðka í sendnu undirlagi (t.d. kvarssandi, finni mól) í gegnumstreymiskerfi og nota fiskafóður sem fæðu í nokkur ár án þess að endurnýja undirlagið. Helsti kosturinn við blóðmaðka umfram aðrar tegundir ána er hröð æxlun sem leiðir til þess að lífmassi í rannsóknarstofuræktuðum stofnum eykst hratt (1., 6. og 9.–10. heimild).

Ræktunaraðferðir

Ræktunarskilyrði fyrir blóðmaðka eru útlistuð í smáatriðum hjá Phipps o.fl. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Stutt samantekt á þessum skilyrðum er tilgreind hér á eftir.

Hægt er að rækta ormana í stórum kerjum (57–80 l) við 23 °C með ljóslotu sem nemur 16 B:8 M (100–1000 lx) og notkun á náttúrulegu vatni sem er endurnýjað daglega (45–50 l á hvert ker). Undirlagið er tilreitt með því að skera óbleiktur, brúnar pappírspurrkur í ræmur sem síðan má bleyta með ræktunaratvati í nokkrar sekúndur til að fá litla búta af pappírundirlagi. Þetta undirlag er síðan hægt að nota strax til að hylja botninn í ræktunarkeri blóðmaðkanna eða frysta það í afjónuðu vatni til síðari nota. Nýtt undirlag í kerinu endist yfirleitt í u.þ.b. tvo mánuði.

Hverri ormarækt er komið á fót með 500–1000 ornum og þeir eru fôðraðir á 10 ml sviflausn, sem inniheldur 6 g af upphafsstöðu fyrir urriða, þrisvar í viku við endurnýjunar- eða gegnumstreymisskilyrði. Fôðra skal kyrrstöðu- eða hálfkyrrstöðuræktir sjaldnar til að koma í veg fyrir bakteríu- og sveppavöxt. Greina skal fôður- og pappírundirlag m.t.t. efna sem á að nota í prófunum á uppsöfnun í lífverum.

Við þessi skilyrði tvöfaldast yfirleitt fjöldi einstaklinga í ræktinni á u.þ.b. 10–14 dögum.

Hægt er að fjarlægja blóðmaðka úr ræktunum, t.d. með því að flytja undirlag með finmöskvuðu neti eða lífverur með því að nota eldsléttuð glerpipettu með stóru opi (u.þ.b. 5 mm þvermál) yfir í annað bikarglas. Ef undirlag er einnig flutt yfir í þetta bikarglas er bikarglasið sem inniheldur orma og undirlag látið bíða yfir nótt við gegnumstreymisskilyrði en það fjarlægir undirlagið úr bikarglasinu en ormanir verða eftir í botninum á ílátinu. Síðan er hægt að setja þá í nýundirbúin ræktunarker eða vinna þá enn frekar fyrir prófunina eins og útlistað er í 1. og 6. heimild. Koma skal í veg fyrir að ormanir skaddist eða sjálfstýfi sig, t.d. með því að nota pipettur með eldsléttuðum brúnum eða stönglum úr ryðfríu stáli til að meðhöndla þá.

Tiltekið atriði skiptir verulegu máli þegar blóðmaðkar eru notaðir í prófunum á uppsöfnun í lífverum með seti en það er æxlunarmátinn (hlutun og síðan endurvöxtur). Þessi kynlaus æxlun leiðir til þess að úr verða tveir hlutar sem éta ekkert í tilteknu tíma þangað til hausinn eða halinn hafa vaxið aftur (t.d. 36.–37. heimild). Þetta merkir að upptaka sets og mengunarefna hjá blóðmökkum við inntöku er e.t.v. ekki samfelld eins og hjá Tubificidae sem fjölga sér ekki með skiptingu.

Þess vegna ætti að framkvæma samhæfingu til að lágmarka stjórnlæsa æxlun og endurmyndun og mikil frávik í prófunarniðurstöðum sem því fylgja. Slík frávik geta orðið þegar einstaklingar, sem hafa skipt sér og éta þar af leiðandi ekkert á tilteknu tímabili, verða fyrir minni váhrifum frá prófunarefninu en aðrir einstaklingar sem skipta sér ekki meðan á prófuninni stendur (t.d. 38. heimild). Skipta skal ormunum í tvennt (samhæfing) 10–14 dögum áður en váhrif hefjast (65. heimild). Nota skal stóra orma sem sýna helst engin merki um nýlega skiptingu. Hægt er að setja ormana á sýnisgler í dropa af ræktunaratvati og skera þá sundur um miðjan bolinn með hníf. Þess skal gætt að afturendarnir séu svipaðir á

stærð. Afturendarnir eru látnir mynda nýja hausa í ræktunarláti, sem inniheldur sama undirlag og notað er í ræktuninni og endurgert vatn, þangað til váhrif hefjast. Það er vísbending um að nýir hausar hafi vaxið aftur þegar samhæfðu ormarnir eru farnir að grafa sig í undirlagið (hægt er að staðfesta að nýir hausar hafi vaxið með því að skoða dæmigert undirsýni í tvísæissmásjá). Reiknað er með því að prófunarlífverurnar séu í svipuðu lífeðlisfræðilegu ástandi eftir það. Þetta þýðir að þegar æxlan með endurvexti á sér stað hjá samhæfðum ormum meðan á prófuninni stendur er reiknað með því að svo til öll dýrin verði fyrir jafn miklum váhrifum af íbætta setinu. Fóðra skal samhæfða orma um leið og ormarnir eru farnir að grafa sig í undirlagið eða 7 dögum eftir sundurskurð. Fóðrunarfyrirkomulagið skal vera sambærilegt og í venjulegum ræktunum en það getur verið ráðlegt að fóðra samhæfðu ormana á sama fóðurgjafa og á að nota í prófuninni. Ormunum skal haldið við prófunarhitastig, við 20 ± 2 °C. Eftir endurvöxt skal nota í prófunina óskaddaða, heila orma af svipaðri stærð, sem synda eða skríða fjörlega við vægt líkamlegt áreiti. Koma skal í veg fyrir að ormarnir skaddist eða sjálfstýfi sig, t.d. með því að nota pipettur með eldsléttuðum brúnum eða stönglum úr ryðfriú stáli til að meðhöndla þá.

Þegar blóðmaðkar eru notaðir í prófunina ætti fjöldi orma að aukast í prófuninni vegna sérstaks fjölgunarmáta þessarar tegundar, ef skilyrðin eru við hæfi (6. heimild). Ef engin æxlan á sér stað í prófun á uppsöfnun í lífverum með *L. variegatus* skal það skráð og tekið til athugunar við túlkun á prófunarniðurstöðum.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (ekki fullgiltir í hringprófun)**

Branchiura sowerbyi búa í margs konar settegundum í lónum, vötnum, tjörnum og ám, upphaflega á svæðum í hitabeltinu. Þá er einnig að finna í hlýjum vatnshlotum á norðurhveli jarðar. Þeir eru þó fleiri í leðju-leirseti sem inniheldur mikið af lífrænu efni. Ormarnir búa ennfremur í setlaginu. Meira að segja afturendi ormana er yfirleitt niðurgrafinn. Þessi tegund er auðþekjanleg á tálknþráðunum (e. *gill filament*) á afturhluta þeirra. Fullvaxnir ormar geta orðið 9–11 cm langir og blautvigtin 40–50 mg. Æxlunarhraði ormana er mikill, þýðið getur tvöfaldast á innan við tveimur vikum við hita- og fóðrunarskilyrði sem lýst er hér á eftir (Aston o fl., 1982, (65. heimild)). *B. sowerbyi* hafa bæði verið notaðir í eituhrifarannsóknum og rannsóknum á uppsöfnun í lífverum (Marchese & Brinkhurst 1996, (31. heimild) Roghair o. fl. 1996, (67. heimild) eftir því sem við á).

Ræktunaraðferðir

Samantekt á ræktunarskilyrðum fyrir *Branchiura sowerbyi* er gefin hér á eftir (frá Mercedes R. Marchese, INALI, Argentínu, og Carla J. Roghair, RIVM, Hollandi).

Ekki er gerð krafa um einhverja eina tækni til að rækta prófunarlífverurnar. Hægt er að rækta lífverurnar með því að nota ómengið, náttúrulegt set (31. heimild). Fengin reynsla hefur sýnt að miðill, sem samanstendur af náttúrulegu seti og sandi, bætir skilyrðin fyrir ormana samanborið við hreint, náttúrulegt set (32. og 67. heimild). Hægt er að nota 3 l bikarglós í ræktunina sem innihalda 1500 ml af seti/vatnsmiðli, sem samanstendur af 375 ml af náttúrulegu, ómenguðu seti (u.þ.b. 10% heildarmagn lífræns kolefnis; u.þ.b. 17% af ögnunum ≤ 63 μ m), 375 ml af hreinum sandi (M32) og 750 ml af endurgerðu eða afklóruðu kranavatni (31.–32. og 67. heimild). Einnig er hægt að nota pappírspurrkur sem undirlag fyrir ræktun en stofnvöxturinn er þá hægari en í náttúrulegu seti. Í hálfkyrstöðukerfum er vatnslagið í bikarglösunum loftað rólega og endurnýja skal yfirliggjandi vatnið einu sinni í viku.

Hvert bikarglas inniheldur til að byrja með 25 unga orma. Eftir tvo mánuði eru stóru ormarnir tíndir úr setinu með tóng og settir í ný bikarglós með seti/vatnsmiðli sem er nýtilreitt. Gamla bikarglasið inniheldur einnig egghylki og unga orma. Með þessu móti er hægt að safna allt að 400 ungum ormum á hvert bikarglas. Hægt er að nota fullvaxna orma til æxlunar í a.m.k. eitt ár.

Halda skal ræktum við hita á bilinu 21 til 25 °C. Halda skal breytileika hitastigs undir ± 2 °C. Sá tími sem þarf fyrir fösturvisisþroskun frá því að egg losnar þangað til ungvíði fer úr egghylki er u.þ.b. þrjár vikur við 25 °C. Í ljós kom að eggjaframleiðsla á hvern lífandi orm af tegundinni *B. sowerbyi* var á bilinu 6,36 (31. heimild) til 11,2 (30. heimild) í leðju við 25 °C. Fjöldi eggja í hverju egghylki er á bilinu frá 1,8 til 2,8 (66. og 69. heimild) eða allt að 8 (68. heimild).

Mæla skal uppleyst sýrefni, vatnshörku, hitastig og sýrustig einu sinni í viku. Hægt er að bæta fiskafóðri (t.d. TetraMin®) við sem sviflausn tvisvar eða þrisvar í viku að vild. Einnig er hægt að fýðra ormana á uppþíddu salati að vild.

Helsti kosturinn við þessa tegund er mikill lífmassi einstaklinga (allt að 40–50 mg blautvigt hver einstaklingur). Þess vegna er hægt að nota þessa tegund til að prófa uppsöfnun á ógeislamerktum prófunarefnum í lífverum. Hægt er að láta hana verða fyrir váhrifum í kerfum, sem notuð eru fyrir *T. tubifex* eða blóðorma, með einn einstakling á hverja samhliða prófun (11. heimild). Í því tilviki skal þó fjölga samhliða prófunum nema notuð séu stærri prófunarflát (11. heimild). Einnig þarf að aðlaga gildisviðmiðanir fyrir þessa tegund í tengslum við atferli við að grafa sig niður.

HEIMILDIR

- 1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- 2) European Commission (EC) (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. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- 3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- 4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- 5) Kafi C.13 í þessum viðauka, Lífbætti: gegnumstreymisprófun á fiskum.
- 6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- 7) Kafi C.27 í þessum viðauka, Prófun á eiturhrifum á mýflugulirfum í seti og vatni með notkun á íbættu seti.
- 8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- 9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty, J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- 10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic *Oligochaete Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ. Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- 11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- 12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

- 13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. *Estuaries* 13, 301-310.
- 14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim
- 15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1709-1725.
- 16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.* 23, 1443-1450.
- 17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- 18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- 19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29, 1501-1514.
- 20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- 21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- 22) Eftirfarandi kaflar í þessum viðauka:
 - Kafi A.4 Gufuþrýstingur
 - Kafi A.5 Yfirborðsspenna
 - Kafi A.6 Vatnsleysni
 - Kafi A.8 Deilistuðull, hristiflöskuaðferð
 - Kafi A.24 Deilistuðull, háþrýstivöskviljunaraðferð
 - Kafi C.7 Niðurbrot án tilstillis lífvera: vatnsrof sem fall af sýrustigi
 - Kafi C.4 A-F Ákvörðun á auðlifbrjótanleika
 - Kafi C.19 Ákvörðun á ásogsstuðli (K_{oc}) í jarðvegi og skólpseyru með háþrýstivöskviljun
 - Kafi C.29 Auðlifbrjótanleiki — koltvísýringur í lokuðum ílátum
- 23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.
- 24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. *Microchem. J.* 43, 165-172.
- 25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J* (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- 26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- 27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- 28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.

- 29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- 30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- 31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.
- 32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.
- 33) Kafi C.1 í þessum viðauka, Prófun á bráðum eiturhrifum á fisk.
- 34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- 35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- 36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- 37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- 38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- 39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- 40) Kafi C.8 í þessum viðauka, Eiturhrif á ánamaðka.
- 41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- 42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.
- 43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, New York.
- 44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- 45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- 46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- 47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- 48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- 49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.

- 50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- 51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- 52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- 53) Zok, S., Göрге, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- 54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- 55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- 56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- 57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- 58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- 59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- 60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- 61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- 62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- 63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- 64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No.* 22.
- 65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- 66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.

-
- 67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
 - 68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
 - 69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274
-