

I

(Πράξεις εγκριθείσες δυνάμει των συνθηκών ΕΚ/Ευρατόμ των οποίων η δημοσίευση είναι υποχρεωτική)

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 761/2009 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 23ης Ιουλίου 2009

για τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH), με σκοπό την προσαρμογή του στην τεχνική πρόοδο

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ⁽¹⁾, και ιδίως το άρθρο 13 παράγραφος 3,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 της Επιτροπής⁽²⁾ περιέχει τις μεθόδους δοκιμών για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας ουσιών, οι οποίες πρέπει να εφαρμόζονται για τους σκοπούς του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006.
- (2) Είναι αναγκαίο να επικαιροποιηθεί ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 ώστε να συμπεριληφθούν οι μεταβολές ορισμένων μεθόδων δοκιμών, καθώς και διάφορες νέες μέθοδοι δοκιμών που εγκρίθηκαν από τον ΟΟΣΑ. Ζητήθηκε η γνώμη των ενδιαφερομένων φορέων σχετικά με την παρούσα πρόταση. Με τις τροποποιήσεις αυτές, οι εν λόγω μέθοδοι προσαρμόζονται στην τεχνική πρόοδο.

- (3) Πρέπει να αναθεωρηθούν οι διατάξεις που αφορούν την τάση ατμών ώστε να συμπεριληφθεί η νέα μέθοδος έκχυσης.
- (4) Είναι αναγκαίο να προστεθεί νέα μέθοδος μέτρησης του σταθμισμένου ως προς το μήκος γεωμετρικού μέσου των διαμέτρων ινών.
- (5) Είναι σκόπιμο να επικαιροποιηθεί ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 για να συμπεριληφθεί κατά προτεραιότητα μια νέα μέθοδος δοκιμών δερματικού ερεθισμού in vitro, ώστε να μειωθεί ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς σκοπούς, σύμφωνα με την οδηγία 86/609/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 24ης Νοεμβρίου 1986, για την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων των κρατών μελών σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς⁽³⁾. Αν και συνεχίζεται στον ΟΟΣΑ η συζήτηση σχεδίου μεθόδου δοκιμών δερματικού ερεθισμού in vitro, είναι σκόπιμο, στην εξαιρετική αυτή περίπτωση, να συμπεριληφθεί η μέθοδος B 46 στον παρόντα κανονισμό. Η μέθοδος B 46 πρέπει να επικαιροποιηθεί το ταχύτερο δυνατόν, μετά την επίτευξη συμφωνίας στον ΟΟΣΑ ή εάν προκύψουν νέα στοιχεία που να δικαιολογούν την αναθεώρηση αυτή.
- (6) Πρέπει να αναθεωρηθούν οι διατάξεις που αφορούν τη δοκιμή αναστολής σε φύκη για να συμπεριληφθούν και άλλα είδη φυκών και να τηρηθούν οι απαιτήσεις εκτίμησης της επικινδυνότητας και ταξινόμησης των χημικών ουσιών.
- (7) Είναι αναγκαίο να προστεθούν νέα μέθοδος μέτρησης της αερόβιας ανοργανοποίησης στα επιφανειακά ύδατα με προσομοιωτική δοκιμή βιοαποικοδόμησης και νέα μέθοδος εκτίμησης της τοξικότητας για τα φυτά του γένους Lemna με δοκιμή αναστολής της ανάπτυξης.

⁽¹⁾ ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1.

⁽²⁾ ΕΕ L 142 της 31.5.2008, σ. 1.

⁽³⁾ ΕΕ L 358 της 18.12.1986, σ. 1

(8) Συνεπώς, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 πρέπει να τροποποιηθεί αναλόγως.

(9) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής που έχει συσταθεί δυνάμει του άρθρου 133 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται ως εξής:

1) Το μέρος Α τροποποιείται ως εξής:

α) το κεφάλαιο Α.4 αντικαθίσταται από το κεφάλαιο Α.4 που παρατίθεται στο παράρτημα Ι του παρόντος κανονισμού·

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 23 Ιουλίου 2009.

β) προστίθεται το κεφάλαιο Α.22 που παρατίθεται στο παράρτημα ΙΙ του παρόντος κανονισμού.

2) Το μέρος Β τροποποιείται ως εξής:

προστίθεται το κεφάλαιο Β.46 που παρατίθεται στο παράρτημα ΙΙΙ του παρόντος κανονισμού.

3) Το μέρος Γ τροποποιείται ως εξής:

α) το κεφάλαιο Γ.3 αντικαθίσταται από το κεφάλαιο Γ.3 που παρατίθεται στο παράρτημα ΙV του παρόντος κανονισμού·

β) προστίθενται τα κεφάλαια Γ.25 και Γ.26 που παρατίθενται στα παραρτήματα V και VI του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Για την Επιτροπή
Σταύρος ΔΗΜΑΣ
Μέλος της Επιτροπής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Α.4. ΤΑΣΗ ΑΤΜΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μέθοδος είναι ισοδύναμη προς τη μέθοδο OECD TG 104 (2004).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα αναθεωρημένη έκδοση της μεθόδου Α.4 (1) περιλαμβάνει έναν επιπρόσθετο τρόπο εξέτασης, την εξέταση με έκχυση: ισόθερμη θερμοβαρυμετρία, μελετημένη για ουσίες με εξαιρετικά χαμηλές τάσεις (μέχρι 10^{-10} Pa). Υπό το πρίσμα αναγκών για διαδικασίες, ιδίως σχετικά με τον προσδιορισμό τάσεων ατμών για ουσίες με χαμηλή τάση ατμών, επαναξιολογούνται και άλλες διαδικασίες της παρούσας μεθόδου όσον αφορά άλλες περιοχές εφαρμοσιμότητας.

Στην κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας, η τάση ατμού καθαρής ουσίας είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας και μόνο. Οι θεμελιώδεις αρχές περιγράφονται αλλού (2)(3).

Δεν είναι δυνατή η εφαρμογή μίας και μόνης διαδικασίας μέτρησης για ολόκληρη την περιοχή τάσεως ατμών από κάτω των 10^{-10} έως 10^5 Pa. Για τη μέτρηση της τάσης ατμών, οκτώ μέθοδοι περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο των οποίων η εφαρμογή είναι δυνατή σε διαφορετικές περιοχές τιμών τάσης. Όσον αφορά την εφαρμογή και την περιοχή μέτρησης, οι διάφορες μέθοδοι συγκρίνονται στον πίνακα 1. Η εφαρμογή των μεθόδων είναι δυνατή μόνο για ενώσεις που δεν αποσυντίθενται υπό τις συνθήκες του πειράματος. Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες για τεχνικούς λόγους δεν είναι δυνατή η εφαρμογή των πειραματικών μεθόδων, η τάση ατμών μπορεί επίσης να εκτιμηθεί, οπότε στο Προσάρτημα περιγράφεται κάποια συνιστώμενη μέθοδος εκτίμησης.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Η τάση ατμών ουσίας ορίζεται ως η τάση κορεσμού υπεράνω στερεάς ή υγρής ουσίας.

Πρέπει να χρησιμοποιείται η μονάδα πίεσης του ΔΣ (Διεθνές σύστημα — SI) που είναι το πασκάλ (Pa). Άλλες μονάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν δίδονται στη συνέχεια μαζί με τους συντελεστές μετατροπής τους.

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

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

$$1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$$

Η μονάδα θερμοκρασίας του ΔΣ είναι ο βαθμός Κέλβιν (K). Η μετατροπή βαθμών Κελσίου σε βαθμούς Κέλβιν γίνεται με τον τύπο:

$$T = t + 273,15$$

όπου T είναι η θερμοκρασία Κέλβιν, ή θερμοδυναμική θερμοκρασία, και t η θερμοκρασία Κελσίου.

Πίνακας 1

Μέθοδος μέτρησης	Ουσίες		Εκτιμώμενη επαναληψιμότητα	Εκτιμώμενη αναπαραγωγιμότητα	Συνιστώμενη περιοχή τιμών
	Στερεές	υγρές			
Δυναμική μέθοδος	Με χαμηλό σημείο τήξης	Ναι	Μέχρι και 25 % 1 έως 5 %	Μέχρι και 25 % 1 έως 5 %	10^3 Pa έως 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa έως 10^5 Pa
Στατική μέθοδος	Ναι	Ναι	5 έως 10 %	5 έως 10 %	10 Pa έως 10^5 Pa 10^{-2} Pa έως 10^5 Pa (1)
Μέθοδος ισοτενισκοπίου	Ναι	Ναι	5 έως 10 %	5 έως 10 %	10^2 Pa έως 10^5 Pa

Μέθοδος μέτρησης	Ουσίες		Εκτιμώμενη επαναληψιμότητα	Εκτιμώμενη αναπαραγωγιμότητα	Συνιστώμενη περιοχή τιμών
	Στερεές	υγρές			
Μέθοδος έκχυσης: ζυγός τάσης ατμών	Ναι	Ναι	5 έως 20 %	Μέχρι και 50 %	10 ⁻³ Pa έως 1 Pa
Μέθοδος έκχυσης: Κυψελίδα Κνούντσεν	Ναι	Ναι	10 έως 30 %	—	10 ⁻¹⁰ Pa έως 1 Pa
Μέθοδος έκχυσης: ισόθερμη θερμοβαρμετρία	Ναι	Ναι	5 έως 30 %	Μέχρι και 50 %	10 ⁻¹⁰ Pa έως 1 Pa
Μέθοδος με κορεσμό αερίου	Ναι	Ναι	10 έως 30 %	Μέχρι και 50 %	10 ⁻¹⁰ Pa έως 10 ³ Pa
Μέθοδος περιδινούμενου στροφέα	Ναι	Ναι	10 έως 20 %	—	10 ⁻⁴ Pa έως 0,5 Pa

(¹) Όταν χρησιμοποιείται μανόμετρο χωρητικότητας.

1.3. ΑΡΧΗ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΜΕΝΗ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ

Γενικά η τάση ατμών προσδιορίζεται σε διάφορες θερμοκρασίες. Σε περιορισμένη περιοχή θερμοκρασιών, ο λογάριθμος της τάσης ατμών καθαρής ουσίας αποτελεί γραμμική συνάρτηση του αντιστρόφου της θερμοδυναμικής θερμοκρασίας, σύμφωνα με την απλουστευμένη εξίσωση Clapeyron-Clausius:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3RT} + \text{σταθερά}$$

όπου:

p = η τάση ατμών σε πασκάλ

ΔH_v = η θερμότητα εξάτμισης σε J mol⁻¹

R = η παγκόσμια σταθερά των αερίων, 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹

T: = η θερμοκρασία σε βαθμούς K

1.4. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η χρησιμοποίηση ουσιών αναφοράς δεν είναι αναγκαία. Χρησιμεύουν πρωταρχικά για τον έλεγχο της εκτέλεσης μεθόδου κατά διαστήματα καθώς επίσης για να καθιστούν δυνατή τη σύγκριση μεταξύ αποτελεσμάτων διάφορων μεθόδων.

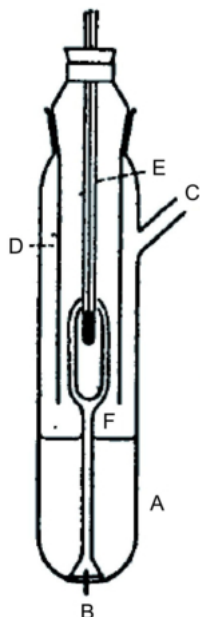
1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.5.1. Δυναμική μέθοδος (Μέθοδος Cottrell)

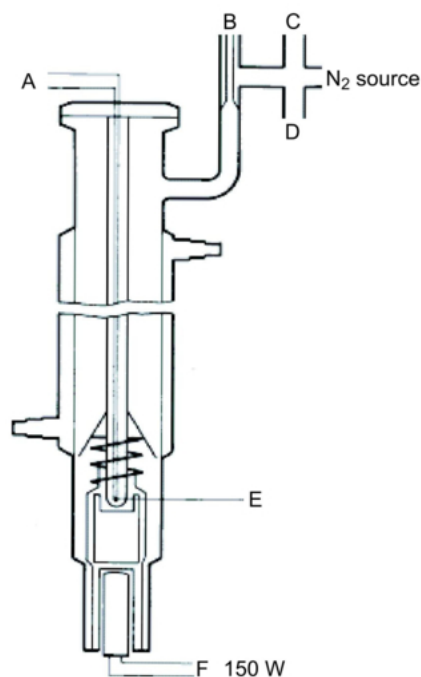
1.5.1.1. Αρχή

Η τάση ατμών προσδιορίζεται με μέτρηση της θερμοκρασίας ζέσεως της ουσίας σε διάφορες προδιαγραφόμενες πιέσεις, χονδρικά μεταξύ 10³ και 10⁵ Pa. Η μέθοδος αυτή συνιστάται επίσης για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας ζέσεως. Για το σκοπό αυτό είναι χρήσιμη μέχρι 600 βαθμούς K. Λόγω της υδροστατικής πίεσης της στήλης υγρού, οι θερμοκρασίες ζέσεως υγρών είναι περίπου κατά 0,1 °C υψηλότερες σε βάθος 3 έως 4 cm σε σχέση με την επιφάνεια. Στη μέθοδο Cottrell (4) το θερμόμετρο τοποθετείται εντός του ατμού υπέρνω της επιφάνειας του υγρού ενώ το ζέον υγρό αυτοαντλείται συνεχώς προσπίπτοντας επάνω στο βολβό του θερμομέτρου. Ο βολβός καλύπτεται από λεπτό στρώμα υγρού που βρίσκεται σε ισορροπία με τον ατμό υπό ατμοσφαιρική πίεση. Έτσι το θερμόμετρο δείχνει το αληθές σημείο ζέσεως, χωρίς σφάλματα λόγω υπερθέρμανσης ή υδροστατικής πίεσης. Η αντλία που χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τον Cottrell παρουσιάζεται στο σχήμα 1. Ο σωλήνας A περιέχει το ζέον υγρό. Την ομοιόμορφη ζέση διευκολύνει σύρμα λευκοχρύσου Β ενσφράγιστο στον πυθμένα. Ο πλευρικός σωλήνας C οδηγεί σε συμπυκνωτή ενώ ο μανδύας D δεν επιτρέπει στο ψυχρό συμπύκνωμα να φθάνει στο θερμόμετρο E. Όταν το υγρό στο σωλήνα A ζέει, φυσαλίδες και υγρό που έχουν παγιδευτεί από τη χοάνη χύνονται μέσω των δύο βραχιόνων της αντλίας F επάνω στο βολβό του θερμομέτρου.

Σχήμα 1



Σχήμα 2



Αντλία Cottrell (4)

A: Θερμοηλεκτρικό στοιχείο

B: Παρένθητος θάλαμος κενού

C: Μετρητής πίεσης

D: Κενό

E: Σημείο μέτρησης

F: Θερμαντικό στοιχείο ισχύος περίπου 150 W

1.5.1.2. Συσκευές

Στο σχήμα 2 παρουσιάζεται συσκευή πολύ μεγάλης ακριβείας, όπου εφαρμόζεται η αρχή Cottrell. Αποτελείται από σωλήνα με τμήμα ζέσεως στο κάτω μέρος του, με ψύκτη στο μεσαίο μέρος και έξοδο και φλάντζα στο άνω μέρος. Η αντλία Cottrell τοποθετείται στο τμήμα ζέσεως το οποίο θερμαίνεται με ηλεκτρικό στοιχείο. Η θερμοκρασία μετριέται με θερμοστοιχείο εντός μανδύα ή με θερμομέτρο αντίστασης εισαγόμενο μέσω της φλάντζας στο άνω μέρος. Η έξοδος συνδέεται με το σύστημα ρύθμισης της πίεσης. Το τελευταίο αυτό αποτελείται από αντλία κενού, παρένθητο θάλαμο, πιεσοστάτη στην υποδοχή αζώτου για ρύθμιση της πίεσης και μανόμετρο.

1.5.1.3. Διαδικασία

Η ουσία τοποθετείται στο τμήμα ζέσεως. Για μη κονιοποιημένα στερεά μπορεί να ανακύψουν προβλήματα τα οποία όμως μερικές φορές είναι δυνατόν να λυθούν με θέρμανση του μανδύα ψύξης. Η συσκευή σφραγίζεται στην φλάντζα και από την ουσία αφαιρούνται τα αέρια. Με τη μέθοδο αυτή δεν είναι δυνατή η μέτρηση για αφρίζουσες ουσίες.

Στη συνέχεια ρυθμίζεται η πίεση στη χαμηλότερη επιθυμητή τιμή και τίθεται σε λειτουργία η θέρμανση. Ταυτοχρόνως ο αισθητήρας θερμοκρασίας συνδέεται σε καταγραφικό όργανο.

Όταν υπό σταθερή πίεση καταγράφεται σταθερή θερμοκρασία ζέσεως, έχει επιτευχθεί ισορροπία. Πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την αποφυγή κραδασμών κατά τη ζέση. Επί πλέον, η συμπύκνωση στον ψύκτη πρέπει να είναι τέλεια. Κατά τον προσδιορισμό της τάσεως ατμών για στερεά χαμηλού σημείου τήξεως πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή έμφραξης του συμπυκνωτή.

Μετά την καταγραφή αυτού του σημείου ισορροπίας, η πίεση ρυθμίζεται σε υψηλότερη τιμή. Η διαδικασία συνεχίζεται με τον ίδιο τρόπο μέχρι την τιμή των 10^5 Pa (συνολικά περίπου 5 ως 10 σημεία μέτρησης). Προς έλεγχο πρέπει να γίνεται επανάληψη για τα σημεία ισορροπίας σε περίπτωση πιέσεων που μειώνονται.

1.5.2. Στατική μέθοδος

1.5.2.1. Αρχή

Κατά τη στατική μέθοδο (5) η τάση ατμών κατά τη θερμοδυναμική ισορροπία προσδιορίζεται για καθορισμένη θερμοκρασία. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για ουσίες και πολυσύνθετα υγρά και στερεά στην περιοχή από 10^2 έως 10^5 Pa και, εφόσον ληφθεί σχετική μέριμνα, και στην περιοχή 1 έως 10 Pa.

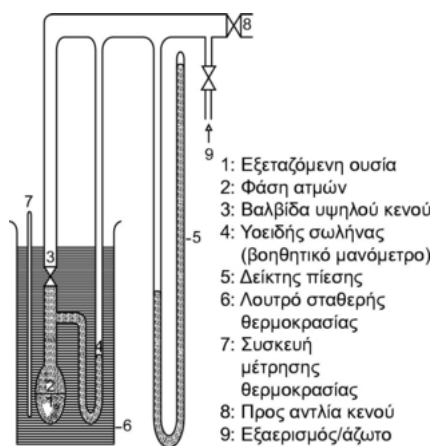
1.5.2.2. Συσκευές

Ο τεχνικός εξοπλισμός αποτελείται από λουτρό σταθερής θερμοκρασίας (ακρίβεια $\pm 0,2$ K), περιέκτη για το δείγμα συνδεδεμένο με γραμμή κενού, μανόμετρο και σύστημα ρύθμισης της πίεσης. Ο θάλαμος δείγματος (σχήμα 3α) συνδέεται με τη γραμμή κενού μέσω βαλβίδας και διαφορικού μανομέτρου (υοειδής σωλήνας ο οποίος περιέχει υγρό κατάλληλο για μανόμετρο) που χρησιμεύει ως δείκτης μηδενός. Κατάλληλα για χρήση στο διαφορικό μανόμετρο είναι ο υδράργυρος, σιλκόνες και φθαλικές ενώσεις, ανάλογα με την περιοχή τιμών τάσης και τη χημική συμπεριφορά της υπό εξέταση ουσίας. Πάντως, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδραργύρου πρέπει να αποφεύγεται για λόγους περιβαλλοντικούς. Η υπό εξέταση ουσία δεν πρέπει να διαλύεται σε βαθμό αισθητό στο υγρό του υοειδή σωλήνα ή να αντιδρά με αυτό. Αντί για υοειδή σωλήνα είναι δυνατή η χρήση μανομέτρου (σχήμα 3β). Στο μανόμετρο είναι δυνατή η χρήση υδραργύρου στην περιοχή τιμών από την κανονική πίεση μέχρι 10^2 Pa ενώ τα υγρά σιλκόνης και οι φθαλικές ενώσεις είναι κατάλληλες για χρήση κάτω από 10^2 Pa και μέχρι 10 Pa. Υπάρχουν άλλα μανόμετρα που μπορεί να χρησιμοποιούνται για πιέσεις κάτω από 10^2 Pa ενώ τα μανόμετρα χωρητικότητας με θερμαινόμενη μεμβράνη είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και κάτω από 10^{-1} Pa. Η θερμοκρασία μετρείται στο εξωτερικό τοίχωμα του σκεύους που περιέχει το δείγμα ή στο ίδιο το σκεύος.

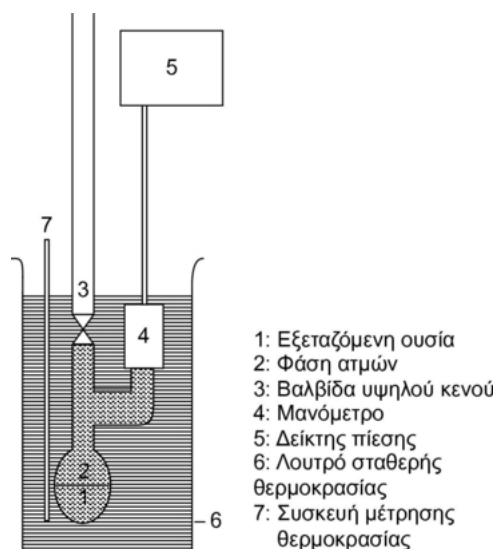
1.5.2.3. Διαδικασία

Χρησιμοποιείται η συσκευή που παρίσταται στο σχήμα 3α. Ο υοειδής σωλήνας πληρώνεται με το υγρό που έχει επιλεγεί και το οποίο, πριν ληφθούν αποτελέσματα μετρήσεων, πρέπει να απαλλαγεί από αέρια με αύξηση της θερμοκρασίας. Η εξεταζόμενη ουσία τοποθετείται στη συσκευή και απαλλάσσεται από αέρια σε μειωμένη θερμοκρασία. Στην περίπτωση πολυσύνθετου δείγματος η θερμοκρασία πρέπει να είναι επαρκώς χαμηλή ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν αλλοιώνεται η σύνθεση του υλικού. Ισορροπία είναι δυνατόν να επιτευχθεί ταχύτερα με ανάδευση. Το δείγμα μπορεί να ψυχθεί με υγρό άζωτο ή ξηρό πάγο πρέπει όμως να ληφθεί μέριμνα για την αποφυγή συμπύκνωσης ατμών του αέρα του αντλούμενου υγρού. Με τη βαλβίδα που βρίσκεται επάνω από το σκεύος του δείγματος ανοικτή εφαρμόζεται επί μερικά λεπτά αναρρόφηση για την αφαίρεση του αέρα. Εφόσον απαιτείται, η διαδικασία αφαίρεσης αερίων επαναλαμβάνεται αρκετές φορές.

Σχήμα 3α



Σχήμα 3β



Όταν το δείγμα θερμαίνεται με τη βαλβίδα κλειστή, η τάση των ατμών αυξάνει. Έτσι μεταβάλλεται η ισορροπία στο υγρό του υοειδή σωλήνα. Για την αντιστάθμιση αυτής της μεταβολής, αφήνεται να εισέλθει στη συσκευή άζωτο ή αέρας μέχρις ότου ο δείκτης διαφορικής πίεσης επανέλθει στο μηδέν. Η απαιτούμενη για αυτό πίεση μπορεί να αναγνωσθεί στο μανόμετρο ή σε όργανο υψηλότερης ακριβείας. Η πίεση αυτή αντιστοιχεί στην τάση ατμών της ουσίας στη θερμοκρασία της μέτρησης. Όταν χρησιμοποιείται η συσκευή που περιγράφεται στο σχήμα 3β, η ανάγνωση της τάσης ατμών γίνεται απευθείας.

Η τάση ατμών προσδιορίζεται σε καταλλήλως μικρά διαστήματα θερμοκρασίας (συνολικά περίπου 5 έως 10 σημεία μέτρησης) μέχρι την επιθυμητή ανώτατη θερμοκρασία.

Προς έλεγχο πρέπει να επαναλαμβάνονται λήψεις μετρήσεων για χαμηλές θερμοκρασίες. Αν οι τιμές που λαμβάνονται κατά την επανάληψη μετρήσεων βρίσκονται εκτός της καμπύλης που έχει προκύψει για αυξημένη θερμοκρασία, αυτό μπορεί να οφείλεται σε κάποιον από τους ακόλουθους λόγους:

- i) το δείγμα εξακολουθεί να περιέχει αέρα (π.χ. στην περίπτωση υλικών υψηλού ιξώδους) ή κατά τη θέρμανση ελευθερώνεται(-ονται) ουσία(-ες) χαμηλού σημείου ζέσεως·
- ii) η ουσία υφίσταται χημική αντίδραση στη διερευνώμενη περιοχή θερμοκρασιών (π.χ. αποσύνθεση, πολυμερισμός).

1.5.3. Μέθοδος ισοτενισκόπιου

1.5.3.1. Αρχή

Το ισοτενισκόπιο (6) βασίζεται στην αρχή της στατικής μεθόδου. Η μέθοδος προβλέπει την τοποθέτηση δείγματος σε βολβοειδή υποδοχή που διατηρείται υπό σταθερή θερμοκρασία και συνδέεται με μανόμετρο και αντλία κενού. Ακαθαρσίες πτητικότερες από την ουσία αφαιρούνται με απαλλαγή από αέρια σε μειωμένη πίεση. Η τάση ατμών του δείγματος σε επιλεγμένες θερμοκρασίες εξισορροπείται από γνωστή πίεση αδρανούς αερίου. Το ισοτενισκόπιο αναπτύχθηκε για τη μέτρηση της τάσης ατμών ορισμένων υγρών υδρογονανθράκων αλλά είναι κατάλληλο για την εξέταση και στερεών. Συνήθως η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για πολυσύνθετα συστήματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν μικρά σφάλματα μόνο για δείγματα που περιέχουν μη πτητικές ακαθαρσίες. Η συνιστώμενη περιοχή τιμών είναι 10^2 έως 10^5 Pa.

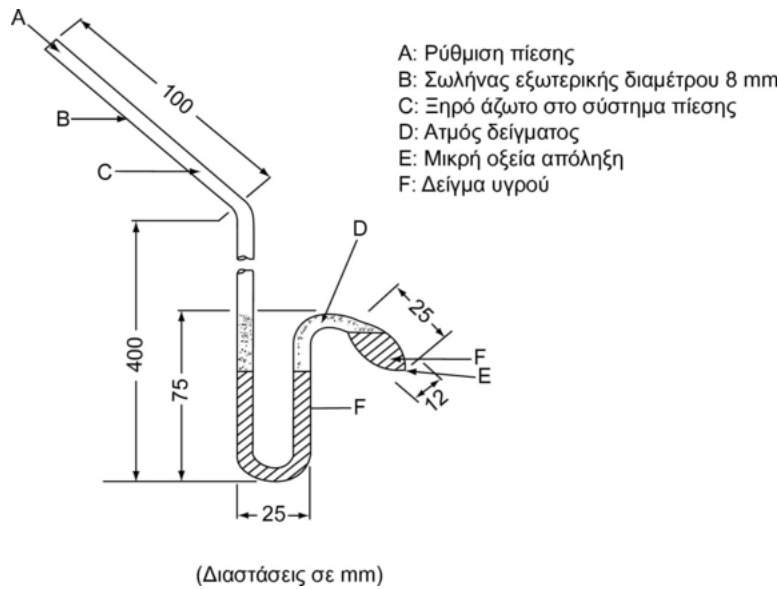
1.5.3.2. Συσκευές

Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται παράδειγμα συσκευής μέτρησης. Πλήρης περιγραφή περιέχεται στο ASTM D 2879-86 (6).

1.5.3.3. Διαδικασία

Στην περίπτωση των υγρών, ως υγρό στο διαφορικό μανόμετρο χρησιμοποιείται η ίδια η ουσία. Στο ισοτενισκόπιο τοποθετείται ποσότητα του υγρού επαρκής για την πλήρωση της βολβοειδούς υποδοχής και του βραχέος σκέλους του μανομέτρου. Το ισοτενισκόπιο συνδέεται με σύστημα κενού, εκκενώνεται και στη συνέχεια πληροúται με άζωτο. Η εκκένωση και η έκπλυση του συστήματος επαναλαμβάνονται δύο φορές για να απομακρυνθεί το εναπομένον οξυγόνο. Το ισοτενισκόπιο που έχει πληρωθεί τοποθετείται σε οριζόντια θέση έτσι ώστε το δείγμα απλώνεται και σχηματίζει λεπτό στρώμα στη βολβοειδή υποδοχή δείγματος και στο μανόμετρο. Η πίεση του συστήματος μειώνεται σε 133 Pa και το δείγμα θερμαίνεται ήπια μέχρις ότου μόλις αρχίσει να ζέει (απομάκρυνση αερίων σε διάλυση). Στη συνέχεια το ισοτενισκόπιο τοποθετείται έτσι ώστε το δείγμα επιστρέφει στη βολβοειδή υποδοχή και πληροú το βραχύ σκέλος του μανομέτρου. Η πίεση διατηρείται στα 133 Pa. Η προέχουσα απόληξη της βολβοειδούς υποδοχής δείγματος θερμαίνεται με μικρή φλόγα μέχρις ότου ο απελευθερούμενος ατμός του δείγματος επεκταθεί επαρκώς ώστε να εκτοπίσει μέρος του δείγματος από το άνω μέρος της βολβοειδούς υποδοχής και του βραχίονα του μανομέτρου στο μανόμετρο, δημιουργώντας χώρο πλήρη με ατμό και ελεύθερο από άζωτο. Κατόπιν το ισοτενισκόπιο τοποθετείται σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας και η πίεση του αζώτου ρυθμίζεται μέχρις ότου εξισωθεί προς την πίεση του δείγματος. Κατά την ισορροπία η πίεση του αζώτου είναι ίση προς την τάση ατμών της ουσίας.

Σχήμα 4



Στην περίπτωση στερεών, και ανάλογα με τις περιοχές τιμών της πίεσης και της θερμοκρασίας, χρησιμοποιούνται ως υγρά μανομέτρου υγρά σιλικόνης ή φθαλικές ενώσεις. Το απαλλαγμένο αερίων υγρό μανομέτρου τοποθετείται σε διεύρυσμα που υπάρχει στο μακρό βραχίονα του ισοτενισκοπίου. Στη συνέχεια το εξεταζόμενο στερεό τοποθετείται στη βολβοειδή υποδοχή δείγματος και απαλλάσσεται από αέρια σε αυξημένη θερμοκρασία. Μετά από αυτά το ισοτενικόσπιο τοποθετείται με κλίση έτσι ώστε το υγρό του μανομέτρου να μπορεί να ρέει στον υσειδή σωλήνα.

1.5.4. Μέθοδος έκχυσης: ζυγός τάσης ατμών (7)

1.5.4.1. Αρχή

Δείγμα της εξεταζόμενης ουσίας θερμαίνεται σε μικρό κλίβανο και τοποθετείται σε γυάλινο κώδωνα υπό κενό. Ο κλίβανος καλύπτεται με κάλυμμα το οποίο φέρει μικρές οπές γνωστών διαμέτρων. Ο ατμός της ουσίας, που διαφεύγει μέσω κάποιας από τις οπές, κατευθύνεται σε δίσκο ζύγισης ζυγού υψηλής ευαισθησίας ο οποίος επίσης περικλείεται στο γυάλινο κώδωνα υπό κενό. Σε ορισμένους τύπους κατασκευής ο δίσκος ζύγισης περιβάλλεται από κιβώτιο ψύξης, για τη διάχυση θερμότητας προς το εξωτερικό με αγωγή, και ψύχεται με ακτινοβολία ώστε να συμπυκνώνεται επάνω του ο διαφεύγων ατμός. Επί του ζυγού επενεργεί ως δύναμη η ορμή της δέσμης ατμού. Η τάση ατμών μπορεί να συναχθεί με δύο τρόπους: άμεσα από τη δύναμη επί του δίσκου ζύγισης καθώς επίσης από την ταχύτητα εξάτμισης με την εξίσωση Hertz-Knudsen (2):

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

όπου:

G = ταχύτητα εξάτμισης ($\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2}$)

M = μοριακή μάζα (g mol^{-1})

T = θερμοκρασία (K)

R = παγκόσμια σταθερά των αερίων ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

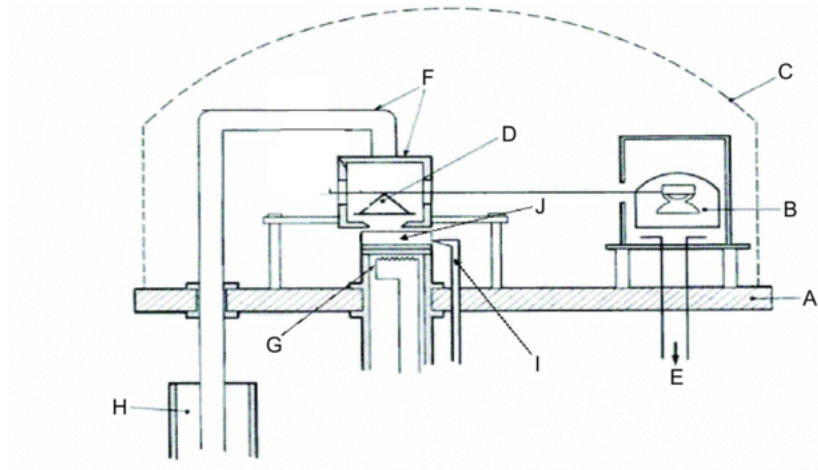
p = τάση ατμών (Pa)

Η συνιστώμενη περιοχή τιμών είναι 10^{-3} έως 1 Pa.

1.5.4.2. α) Συσκευές

Η γενική αρχή της συσκευής παρουσιάζεται στο σχήμα 5.

Σχήμα 5



- | | |
|---------------------------|-------------------------------------|
| A: Πλάκα βάσης | F: Κιβώτιο ψύξης και ψυκτική ράβδος |
| B: Όργανο κινητού πηνίου | G: Κλίβανος για εξάτμιση |
| C: Γυάλινος κώδωνας | H: Δοχείο Ντιούαρ με υγρό άζωτο |
| D: Ζυγός με δίσκο ζύγισης | I: Μέτρηση θερμοκρασίας δείγματος |
| E: Συσκευή μέτρησης κενού | J: Εξεταζόμενη ουσία |

1.5.5. Μέθοδος έκχυσης: κυψελίδα Κνούντσεν

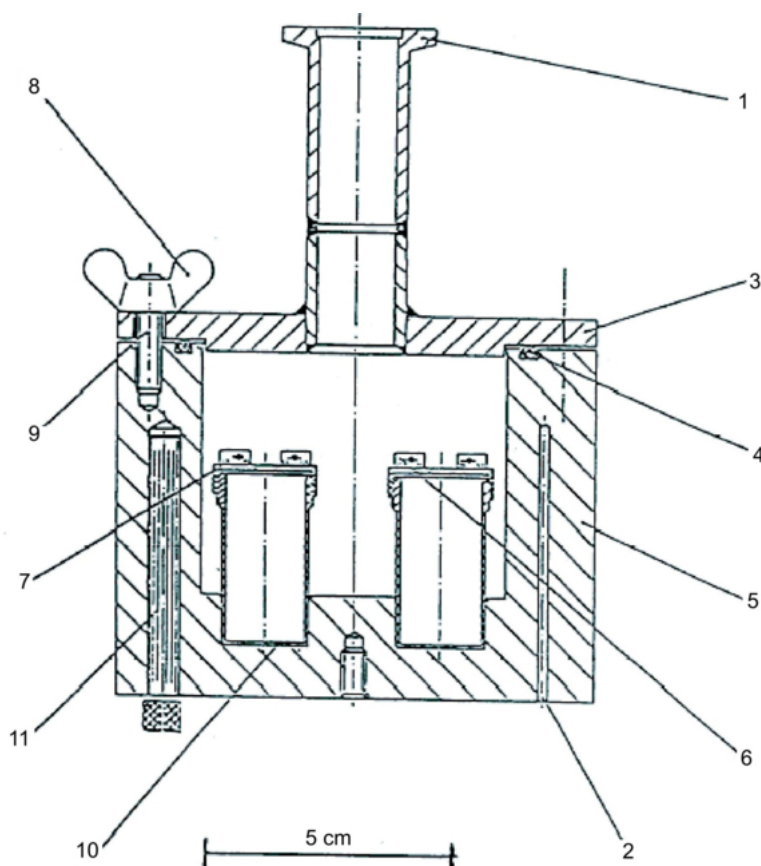
1.5.5.1. Αρχή

Η μέθοδος βασίζεται στην εκτίμηση της μάζας εξεταζόμενης ουσίας που εκρέει ανά μονάδα χρόνου από κυψελίδα Knudsen (8) υπό μορφή ατμού, μέσω μικροανοίγματος υπό συνθήκες υπερυψηλού κενού. Η μάζα εκχεόμενου ατμού είναι δυνατόν να προκύψει είτε με προσδιορισμό της απώλειας μάζας της κυψελίδας είτε με συμπίκνωση του ατμού σε χαμηλή θερμοκρασία και προσδιορισμό της ποσότητας ουσίας που εξατμίστηκε με χρησιμοποίηση χρωματογραφίας. Η τάση ατμών υπολογίζεται εφαρμόζοντας τη σχέση Hertz-Knudsen (βλέπε σημείο 1.5.4.1) με διορθωτικούς συντελεστές που εξαρτώνται από παραμέτρους της συσκευής (9). Η συνιστώμενη περιοχή τιμών είναι 10^{-10} έως 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. Συσκευές

Η γενική αρχή της συσκευής παρουσιάζεται στο σχήμα 6.

Σχήμα 6



- | | |
|--|---|
| 1: Σύνδεση προς κενό | 7: Κοχλιοτομημένο κάλυμμα |
| 2: Κοιλότητες από θερμομέτρο αντίστασης λευκοχρύσου | 8: Περικόχλια (παξιμάδια) τύπου πεταλούδας ή μέτρηση και ρύθμιση θερμοκρασίας |
| 3: Κάλυμμα για δοχείο κενού | 9: Αμφικόχλια (βίδες με παξιμάδια) |
| 4: Δακτύλιος O | 10: Κυψελίδες έκχυσης από ανοξείδωτο χάλυβα |
| 5: Δοχείο κενού από αλουμίνιο | 11: Θερμαντικό στοιχείο |
| 6: Συσκευή για τοποθέτηση και αφαίρεση των κυψελίδων έκχυσης | |

1.5.6. Μέθοδος έκχυσης: ισόθερμη θερμοβαρμετρία

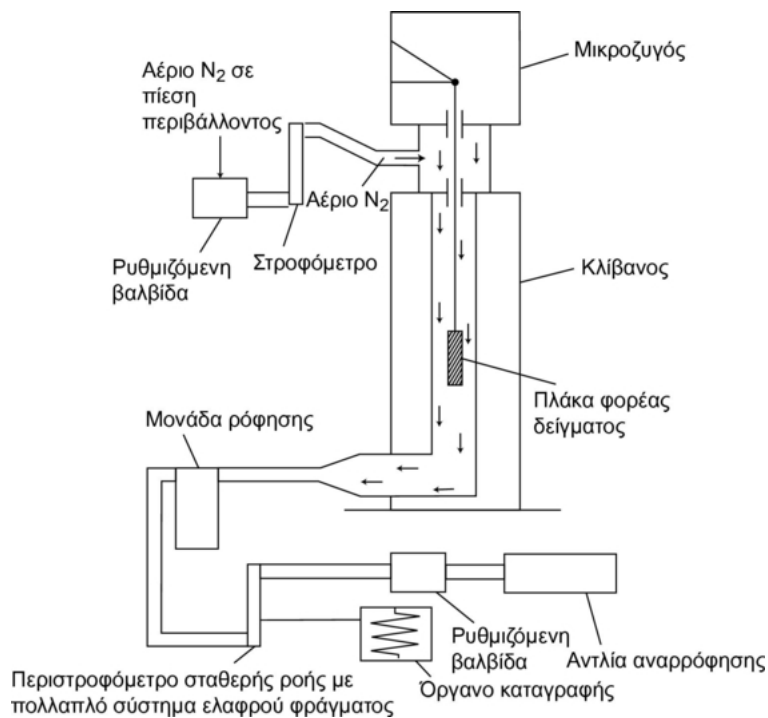
1.5.6.1. Αρχή

Η μέθοδος βασίζεται στον προσδιορισμό επιταχυνόμενων ρυθμών εξάτμισης για την εξεταζόμενη ουσία σε αυξημένες θερμοκρασίες και πίεση περιβάλλοντος με χρήση θερμοβαρμετρίας (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Οι ταχύτητες εξάτμισης v_T προκύπτουν με την έκθεση της επιλεγείσας ένωσης σε ατμόσφαιρα βραδέως ρέοντος αδρανούς αερίου και την παρακολούθηση της απώλειας βάρους σε καθορισμένες ισόθερμες θερμοκρασίες Κέλβιν T κατά τα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα. Οι τάσεις ατμών p_T υπολογίζονται από τις τιμές v_T με εφαρμογή της γραμμικής σχέσης μεταξύ του λογαρίθμου της τάσης ατμών και του λογαρίθμου της ταχύτητας εξάτμισης. Εφόσον είναι αναγκαίο, είναι δυνατή η παρεκβολή σε θερμοκρασίες 20 και 25 °C με ανάλυση παλινδρόμησης του $\log p_T$ προς $1/T$. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για ουσίες με τάσεις ατμών έως 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) και με καθαρότητα κατά το δυνατόν πλησιέστερη προς 100 % ώστε να αποφεύγεται η παρερμηνεία των μετρούμενων απωλειών βάρους.

1.5.6.2. Συσκευές

Στο σχήμα 7 παρουσιάζεται η γενική αρχή της πειραματικής διάταξης.

Σχήμα 7



Η πλάκα φορέας του δείγματος, εξαρτημένη από μικροζυγό σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας, σαρώνεται από ρεύμα ξηρού αερίου αζώτου το οποίο παρασύρει τα εξατμισθέντα μόρια της εξεταζόμενης ουσίας. Μετά την έξοδο από το θάλαμο, το αέριο ρεύμα υφίσταται καθαρισμό σε μονάδα ρόφησης.

1.5.6.3. Διαδικασία

Η εξεταζόμενη ουσία τοποθετείται ως ομοιογενές στρώμα στην επιφάνεια γυάλινης πλάκας που έχει τραχυνθεί. Στην περίπτωση στερεών, η πλάκα βρέχεται ομοιομόρφως με διάλυμα της ουσίας σε κατάλληλο διαλύτη και ξηραίνεται σε αδρανή ατμόσφαιρα. Για τη μέτρηση, η επικαλυμμένη επιφάνεια κρέμεται μέσα στο θερμοβαρμετρικό αναλυτή και στη συνέχεια μετριέται συνεχώς η απώλεια βάρους της σε συνάρτηση με το χρόνο.

Η ταχύτητα εξάτμισης v_T σε καθορισμένη θερμοκρασία υπολογίζεται από την απώλεια βάρους Δm της πλάκας με το δείγμα με τη σχέση

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

όπου F είναι το εμβαδόν της επιφάνειας των επικαλυμμένων εξεταζόμενων ουσιών, κανονικά το εμβαδόν της επιφάνειας της πλάκας με το δείγμα, και t ο χρόνος για την απώλεια βάρους Δm .

Η τάση ατμών p_T υπολογίζεται με βάση τη συνάρτησή της με την ταχύτητα εξάτμισης v_T :

$$\log p_T = C + D \log v_T$$

όπου C και D είναι σταθερές ίδιες της χρησιμοποιούμενης πειραματικής διάταξης, εξαρτώμενες από τη διάμετρο του θαλάμου μέτρησης και από την ταχύτητα ροής του αερίου. Οι σταθερές αυτές πρέπει να προσδιορίζονται άπαξ με μέτρηση συνόλου ενώσεων γνωστής τάσης ατμών και παλινδρόμηση $\log p_T$ προς $\log v_T$ (11)(21)(22).

Η σχέση μεταξύ της τάσης ατμών p_T και της θερμοκρασίας Κέλβιν T δίδεται από τη σχέση

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

όπου A και B είναι σταθερές που προκύπτουν με την παλινδρόμηση $\text{log } p_T$ προς $1/T$. Με την εξίσωση αυτή η τάση ατμών μπορεί να υπολογιστεί για κάθε άλλη θερμοκρασία με παρεμβολή.

1.5.7. Μέθοδος με κορεσμό αερίου (23)

1.5.7.1. Αρχή

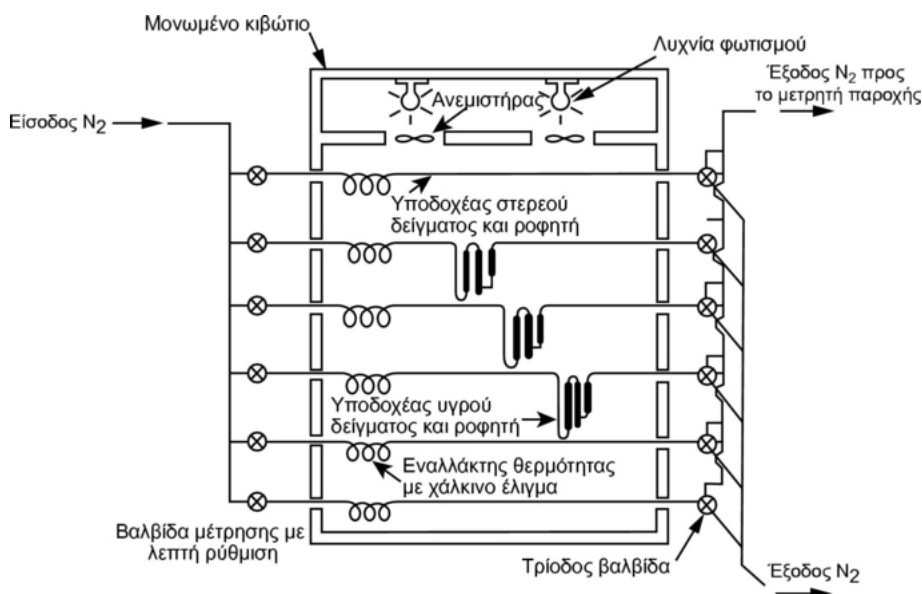
Σε θερμοκρασία χώρου και με γνωστή παροχή διέρχεται αδρανές αέριο μέσω ή υπεράνω δείγματος της εξεταζόμενης ουσίας, αρκετά βραδέως ώστε να εξασφαλίζεται ο κορεσμός. Η επίτευξη κορεσμού στην αέρια φάση είναι κρίσιμη σημασίας. Η μεταφερόμενη ουσία παγιδεύεται, γενικώς με χρησιμοποίηση ροφητή, και προσδιορίζεται η ποσότητά της. Εναλλακτικώς προς την παγίδευση ατμού και την επακόλουθη ανάλυση, για τον προσδιορισμό της ποσότητας μεταφερόμενης ύλης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν εντός διαδικασίας αναλυτικές τεχνικές όπως η αέρια χρωματογραφία. Η τάση ατμών υπολογίζεται με την παραδοχή ότι ισχύει ο νόμος των τελειών αερίων και ότι η συνολική τάση μείγματος αερίων ισούται προς το άθροισμα των τάσεων των συστατικών αερίων. Η μερική τάση της εξεταζόμενης ουσίας, δηλαδή η τάση ατμών, υπολογίζεται από το γνωστό ολικό όγκο αερίου και από το βάρος της μεταφερθείσας ύλης.

Η διαδικασία κορεσμού αερίου μπορεί να εφαρμόζεται για στερεές ή υγρές ουσίες. Είναι δυνατή η χρήση της για τάσεις ατμών χαμηλές μέχρι 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Η μέθοδος παρουσιάζει τη μέγιστη αξιοπιστία για τάσεις ατμών κάτω των 10^3 Pa. Άνω των 10^3 Pa οι τάσεις ατμών γενικώς υπερεκτιμώνται, πιθανώς λόγω σχηματισμού αερολυμάτων. Εφόσον οι μετρήσεις τάσεων ατμών εκτελούνται σε θερμοκρασία χώρου, δεν είναι αναγκαία η παρεμβολή δεδομένων για υψηλές θερμοκρασίες και αποφεύγεται η παρεμβολή για υψηλή θερμοκρασία, η οποία συχνά μπορεί να προκαλέσει σοβαρά σφάλματα.

1.5.7.2. Συσκευές

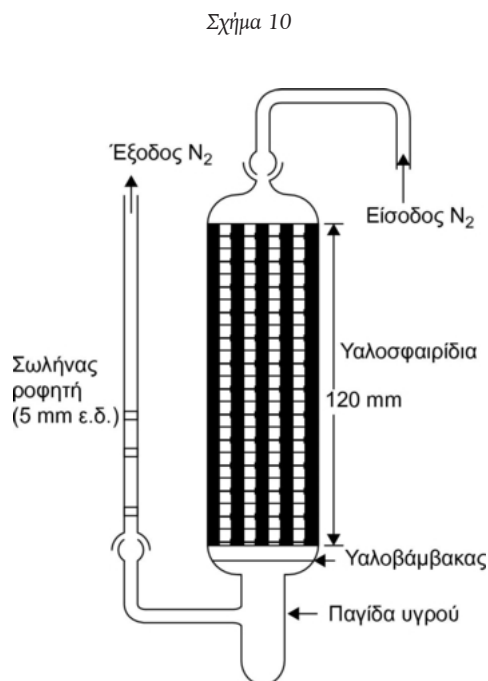
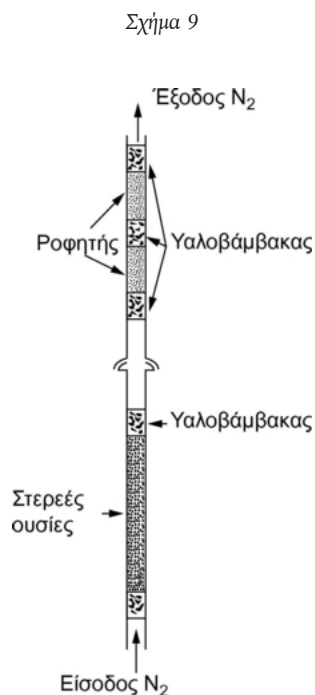
Η διαδικασία απαιτεί τη χρήση κιβωτίου σταθερής θερμοκρασίας. Το σκαρίφημα στο σχήμα 8 παρουσιάζει κιβώτιο όπου υπάρχουν τρεις υποδοχείς στερεού δείγματος και τρεις υποδοχείς υγρού δείγματος, οπότε είναι δυνατός ο τριπλασιασμός ανάλυσης είτε στερεού είτε υγρού δείγματος. Η ρύθμιση θερμοκρασίας πραγματοποιείται μέχρι $\pm 0,5$ °C ή λιγότερο.

Σχήμα 8



Γενικώς, ως αδρανής αέριος φορέας χρησιμοποιείται το άζωτο αλλά, περιστασιακά, είναι δυνατόν να απαιτείται κάποιο άλλο αέριο (24). Ο αέριος φορέας πρέπει να είναι ξηρός. Το αέριο ρεύμα διαχωρίζεται σε 6 ρεύματα, ελεγχόμενα από βαλβίδες βελόνας (οπής περίπου 0,79 mm), και εισρέει στο κιβώτιο μέσω χαλκίνου σωλήνα εσωτερικής διαμέτρου 3,8 mm. Μετά την επίτευξη θερμοκρασιακής ισορροπίας, το αέριο ρέει μέσω του δείγματος και της παγίδας ροφητή και εξέρχεται από το κιβώτιο.

Τα στερεά δείγματα τοποθετούνται εντός γυάλινων σωλήνων εσωτερικής διαμέτρου 5 mm μεταξύ σβώλων υαλοβάμβακα (βλέπε σχήμα 9). Το σχήμα 10 παρουσιάζει υποδοχέα υγρού δείγματος και σύστημα ροφητή. Η πλέον αναπαραγώγιμη μέθοδος για μέτρηση της τάσης ατμών υγρών είναι η επικάλυψη με το υγρό υαλοσφαιρίδιον ή αδρανή ροφητή όπως άμμου και η πλήρωση του υποδοχέα με τα υαλοσφαιρίδια αυτά. Εναλλακτικώς, ο αέριος φορέας είναι δυνατόν να διοχετευθεί μέσα σε τραχείας υφής υαλώδες πυριτικό μείγμα και να σχηματίσει φυσαλίδες διερχόμενος μέσω στήλης της εξεταζόμενης υγρής ουσίας.



Το σύστημα ροφητή περιλαμβάνει ένα εμπρόσθιο και ένα εφεδρικό τμήμα ροφητή. Σε πολύ χαμηλές τάσεις ατμών από το ροφητή κατακρατούνται μικρές μόνο ποσότητες και η προσρόφηση στον υαλοβάμβακα και στο γυάλινο σωλήνα μεταξύ του δείγματος και του ροφητή μπορεί να αποτελέσει σοβαρό πρόβλημα.

Άλλος αποτελεσματικός τρόπος για τη συλλογή της εξατμισμένης ύλης αποτελούν οι παγίδες που ψύχονται με στερεό CO_2 . Οι παγίδες αυτές δεν προκαλούν καθόλου αντίδραση στη στήλη του κορεστήρα ενώ είναι ευχερές και η ποσοτική αφαίρεση της παγιδευμένης ύλης.

1.5.7.3. Διαδικασία

Η ταχύτητα ροής του εκρέοντος αερίου φορέα μετρείται υπό θερμοκρασία χώρου. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η παροχή ελέγχεται συχνά ώστε να διασφαλίζεται η ακρίβεια τιμής για το συνολικό όγκο αερίου φορέα. Είναι προτιμότερη η συνεχής παρακολούθηση με μετρητή παροχής μάζας. Για τον κορεσμό της αέριας φάσης είναι δυνατόν να απαιτηθεί σημαντικός χρόνος επαφής και, κατά συνέπεια, αρκετά χαμηλές παροχές αερίου (25).

Κατά το τέλος του πειράματος αναλύονται ξεχωριστά και το εμπρόσθιο και το εφεδρικό τμήμα του ροφητή. Σε κάθε τμήμα η ένωση εκροφάται με προσθήκη διαλύτη. Τα διαλύματα που προκύπτουν αναλύονται ποσοτικώς για τον προσδιορισμό του βάρους που εκροφήθηκε από κάθε τμήμα. Η επιλογή της αναλυτικής μεθόδου (καθώς και η επιλογή ροφητή και διαλύτη εκρόφησης) υπαγορεύεται από τη φύση του εξεταζόμενου υλικού. Η απόδοση εκρόφησης προσδιορίζεται με έκχυση γνωστής ποσότητας δείγματος στο ροφητή, την εκρόφηση του και την ανάλυση της ανακτώμενης ποσότητας. Είναι σημαντικό να ελέγχεται η απόδοση εκρόφησης στη συγκέντρωση του δείγματος ή πλησίον της υπό τις συνθήκες του πειράματος.

Προκειμένου να διασφαλίζεται ότι ο αέριος φορέας υφίσταται κορεσμό με την εξεταζόμενη ουσία, χρησιμοποιούνται τρεις διαφορετικές παροχές αερίου. Εφόσον η υπολογιζόμενη τάση ατμών δεν εμφανίζει εξάρτηση από την παροχή, θεωρείται ότι το αέριο έχει κορεσθεί.

Η τάση ατμών υπολογίζεται με την εξίσωση:

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

όπου:

- p = η τάση ατμών (Pa)
 W = η μάζα της εξεταζόμενης ουσίας που εξατμίστηκε (g)
 V = ο όγκος του κορεσμένου αερίου (m^3)
 R = η παγκόσμια σταθερά των αερίων 8,314 ($J mol^{-1} K^{-1}$)
 T = η θερμοκρασία (K)
 M = η μοριακή μάζα της εξεταζόμενης ουσίας ($g mol^{-1}$)

Οι μετρούμενοι όγκοι πρέπει να διορθώνονται όσον αφορά διαφορές πίεσης και θερμοκρασίας μεταξύ του μετρητή παροχής και του κορεστήρα.

1.5.8. Περιδινούμενος στροφέας

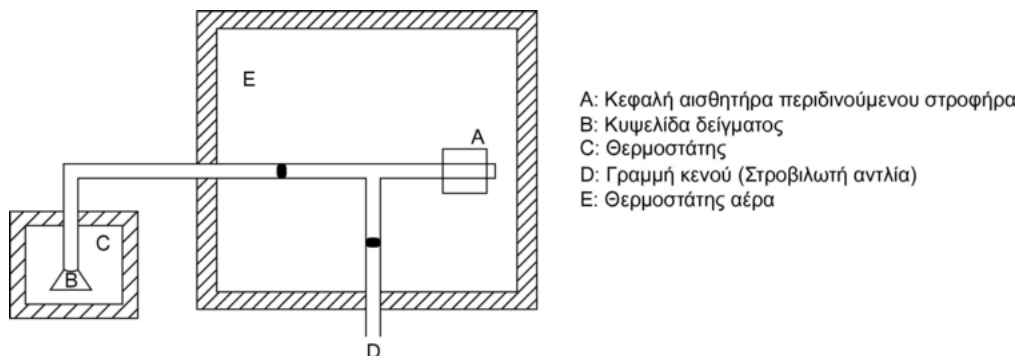
1.5.8.1. Αρχή

Η μέθοδος χρησιμοποιεί μετρητή ιξώδους με περιδινούμενο στροφέα, όπου το στοιχείο μέτρησης είναι μικρή χαλύβδινη σφαίρα η οποία, αιωρούμενη σε μαγνητικό πεδίο, τίθεται σε περιδίνηση από περιστρεφόμενα πεδία (26)(27)(28). Με πηνία λήψης είναι δυνατή η μέτρηση της ταχύτητας περιδίνησης. Όταν η σφαίρα αποκτήσει δεδομένη ταχύτητα περιστροφής, συνήθως περίπου 400 περιστροφές ανά δευτερόλεπτο, διακόπτεται ο εξαναγκασμός σε περιδίνηση και επέρχεται επιβράδυνση λόγω τριβής με το αέριο. Μετρείται η πτώση της ταχύτητας περιστροφής ως συνάρτηση του χρόνου. Η τάση ατμών συνάγεται από την εξαρτώμενη από την πίεση επιβράδυνση της χαλύβδινης σφαίρας. Η συνιστώμενη περιοχή τιμών είναι 10^{-4} έως 0,5 Pa.

1.5.8.2. Συσκευές

Σχηματικό διάγραμμα της πειραματικής διάταξης παρίσταται στο σχήμα 11. Η κεφαλή μέτρησης τοποθετείται εντός περιβλήματος υπό σταθερή θερμοκρασία ρυθμιζόμενη ανά 0,1 °C. Ο περιέκτης με το δείγμα τοποθετείται σε ξεχωριστό περίβλημα, επίσης υπό θερμοκρασία ρυθμιζόμενη ανά 0,1 °C. Όλα τα υπόλοιπα μέρη της διάταξης βρίσκονται σε υψηλότερη θερμοκρασία ώστε να αποτρέπεται η συμπύκνωση. Ολόκληρη η συσκευή συνδέεται με σύστημα υψηλού κενού.

Σχήμα 11



2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

2.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Με οποιαδήποτε από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν η τάση ατμών πρέπει να προσδιορίζεται για δύο τουλάχιστον θερμοκρασίες. Στην περιοχή από 0 έως 50 °C είναι προτιμότερες τρεις ή περισσότερες ώστε να ελέγχεται η γραμμικότητα της καμπύλης της τάσης ατμών. Στις περιπτώσεις της μεθόδου έκχυσης (κυψελίδα Knudsen και ισόθερμη θερμοβαρμετρία) καθώς και της μεθόδου με κορεσμό αερίου, για τη θερμοκρασία μέτρησης συνιστάται η περιοχή 120 έως 150 °C αντί της περιοχής 0 έως 50 °C.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

- χρησιμοποιηθείσα μέθοδος,
- επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτότητα και προσμείξεις) και προκαταρκτική φάση καθαρισμού, εφόσον υπάρχει,
- τουλάχιστον δύο τιμές τάσης ατμών και θερμοκρασίας — και κατά προτίμηση τρεις ή περισσότερες — απαιτούμενες στην περιοχή από 0 έως 50 °C (ή 120 έως 150 °C),
- τουλάχιστον μία από τις θερμοκρασίες πρέπει να είναι ίση ή μικρότερη από 25 °C, εφόσον αυτό είναι τεχνικά δυνατό για την επιλεγείσα μέθοδο,
- όλα τα αρχικά δεδομένα,
- καμπύλη του $\log p$ συναρτήσει του $1/T_a$,
- κατ'επίσημη τιμή της τάσης ατμών σε θερμοκρασία 20 ή 25 °C.

Αν παρατηρήθηκε κάποια μεταβατική κατάσταση (μεταβολή κατάστασης, αποσύνθεση), πρέπει να παρέχονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

- φύση της μεταβολής,
- θερμοκρασία στην οποία επέρχεται η μεταβολή υπό ατμοσφαιρική πίεση,
- τάση ατμών σε 10 και 20 °C κάτω από τη θερμοκρασία της μεταβατικής κατάστασης και 10 και 20 °C επάνω από τη θερμοκρασία αυτή (εκτός αν πρόκειται για μετάβαση από στερεό σε αέριο).

Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις που έχουν σχέση με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα όσον αφορά τις ακαθαρσίες και τη φυσική κατάσταση της ουσίας.

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*, L 383 A, 26-47 (1992).
- (2) Ambrose, D. (1975). *Experimental Thermodynamics*, Valhi, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, Λονδίνο.
- (3) Weissberger R., (1959). *Technique of Organic Chemistry*, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., Νέα Υόρκη.
- (4) Glasstone, S. (1946). *Textbook of Physical Chemistry*, 2nd ed., Van Nostrand Company, Νέα Υόρκη.
- (5) NF T 20-048 AFNOR (Σεπτέμβριος 1985). *Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^5 Pa — Static method.*
- (6) ASTM D 2879-86, *Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.*
- (7) NF T 20-047 AFNOR (Σεπτέμβριος 1985). *Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.*
- (8) Knudsen, M. (1909). *Ann. Phys. Lpz.*, 29, 1979; (1911), 34, 593.
- (9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). *J. Chem. Thermodynamics* 7, 1173.
- (10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), *Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science* 56, 521-532.
- (11) Tomlin, C.D.S. (ed.), *The Pesticide Manual*, Δωδέκατη έκδοση (2000).

- (12) Friedrich, K., Stambach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. *J. Chromatog.* 16 (1964), 22-28
 - (13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., *Pesticide Science* 16 (1982), 269-278.
 - (14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, *Thermochimia Acta* 112 Issue 1 (1987), 117-122.
 - (15) Gückel, W., Synnatschke, G., Rittig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; *Pesticide Science* 4 (1973) 137-147.
 - (16) Gückel, W., Synnatschke, G., Rittig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; *Pesticide Science* 5 (1974) 393-400.
 - (17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Μέρος III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; *Pesticide Science* 13 (1982) 161-168.
 - (18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Μέρος IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; *Pesticide Science* 45 (1995) 27-31.
 - (19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); *Pesticide Science* 53 (1998) 300-310.
 - (20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; *Journal of Pharmaceutical Science* 87(12) (1998) 1512-20.
 - (21) Lide, D.R. (ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.
 - (22) Meister, R.T. (ed.), *Farm Chemicals Handbook*, Vol. 88 (2002)
 - (23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC
 - (24) Rordorf B.F. (1985). *Thermochimica Acta* 85, 435.
 - (25) Westcott et al. (1981). *Environ. Sci. Technol.* 15, 1375.
 - (26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 5(4), 2440.
 - (27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). *J. Vac. Sci. Technol.* 17(2), 642.
 - (28) Fremerey, J.K. (1985). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 3(3), 1715.
-

Προσάρτημα

Μέθοδος εκτίμησης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατ' εκτίμηση τιμές της τάσης ατμών είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται:

- για να αποφασισθεί ποια από τις πειραματικές μεθόδους είναι κατάλληλη,
- για να προκύψει μια κατ' εκτίμηση ή οριακή τιμή σε περιπτώσεις στις οποίες για τεχνικούς λόγους δεν είναι δυνατή η εφαρμογή της πειραματικής μεθόδου.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ

Η εκτίμηση της τάσης ατμών υγρών και στερεών είναι δυνατή με χρησιμοποίηση του τροποποιημένου συσχετισμού Watson (α). Το μοναδικό απαιτούμενο πειραματικό δεδομένο είναι το κανονικό σημείο ζέσεως. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμόζεται για την περιοχή τιμών τάσης από 10^5 Pa έως 10^{-5} Pa.

Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη μέθοδο δίδονται στο «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» (Εγχειρίδιο μεθόδων εκτίμησης χημικών ιδιοτήτων) (β). Βλέπε επίσης OECD Environmental Monograph (Μονογραφία ΟΟΣΑ για το περιβάλλον) Νο.67 (γ).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

Η τάση ατμών υπολογίζεται με τους τύπους:

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

όπου:

- T = η ζητούμενη θερμοκρασία
- T_b = το κανονικό σημείο ζέσεως
- P_{vp} = η τάση ατμών σε θερμοκρασία T
- ΔH_{vb} = η θερμότητα εξάτμισης
- ΔZ_b = ο συντελεστής συμπίεστικότητας (κατ' εκτίμηση 0,97)
- m = εμπειρικός συντελεστής εξαρτώμενος από τη φυσική κατάσταση στη ζητούμενη θερμοκρασία.

και, στη συνέχεια,

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

όπου K_F εμπειρικός συντελεστής με τον οποίο λαμβάνεται υπόψη η πολικότητα της ουσίας. Για τους διάφορους τύπους ενώσεων οι συντελεστές K_F δίδονται στη βιβλιογραφική παραπομπή (β).

Αρκετά συχνά είναι διαθέσιμα δεδομένα όπου περιλαμβάνεται σημείο ζέσεως για μειωμένη πίεση. Στην περίπτωση αυτή η τάση ατμών υπολογίζεται ως εξής:

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

όπου T_1 είναι το σημείο ζέσεως στη μειωμένη πίεση P_1 .

ΕΚΘΕΣΗ

Εφόσον χρησιμοποιείται η μέθοδος της εκτίμησης, η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει εκτενή τεκμηρίωση του υπολογισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- α) Watson, K.M. (1943). *Ind. Eng. Chem*, 35, 398.
 - β) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*, McGraw-Hill.
 - γ) OECD Environmental Monograph No.67. *Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment* (1993).
-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

A.22. ΣΤΑΘΜΙΣΜΕΝΟΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΜΗΚΟΣ, ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΟΣ ΜΕΣΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΙΝΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα μέθοδο περιγράφεται διαδικασία για τη μέτρηση του σταθμισμένου ως προς το μήκος, γεωμετρικού μέσου των διαμέτρων (σΜΓΜΔ) τεχνητών ορυκτών ινών (TOPI) χύμα. Δεδομένου ότι υπάρχει πιθανότητα 95 % να περικλείεται η ΣΜΓΜΔ του πληθυσμού εντός των ορίων εμπιστοσύνης 95 % (σΜΓΜΔ ± [2 × Τυπικό σφάλμα]) του δείγματος, η αναφερόμενη τιμή (η τιμή που προκύπτει από τη δοκιμή) είναι το κατώτερο όριο εμπιστοσύνης του δείγματος (δηλαδή ΣΜΓΜΔ — [2 × Τυπικό σφάλμα]). Η μέθοδος βασίζεται σε επικαιροποίηση (Ιούνιος 1994) ενός σχεδίου διαδικασίας για τη βιομηχανία, της βρετανικής Υπηρεσίας Υγείας και Ασφάλειας στην Εργασία (HSE), το οποίο εγκρίθηκε σε σύσκεψη της ECFIA (Ευρωπαϊκή Ένωση Βιομηχανιών Κεραμικών Ινών) και της HSE στο Chester στις 26.9.1993 και εκπονήθηκε για μια δεύτερη διεργαστηριακή δοκιμή, της οποίας τα αποτελέσματα ελήφθησαν υπόψη (1, 2). Η εν λόγω μέθοδος μετρήσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό της διαμέτρου των ινών σε ουσίες ή προϊόντα χύμα που περιέχουν TOPI, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι πυρίμαχες κεραμικές ίνες, οι τεχνητές υαλώδεις ίνες, οι κρυσταλλικές και πολυκρυσταλλικές ίνες.

Η στάθμιση ως προς το μήκος είναι ένας τρόπος αντιστάθμισης της επίδρασης που έχει στην κατανομή των διαμέτρων που προκύπτει από τη θραύση των μεγάλου μήκους ινών κατά τη δειγματοληψία ή το χειρισμό του υλικού. Για τη μέτρηση της κατανομής μεγέθους των διαμέτρων των TOPI χρησιμοποιείται γεωμετρική στατιστική (γεωμετρικός μέσος), επειδή οι εν λόγω διάμετροι εμφανίζουν συνήθως κατανομές μεγέθους που προσεγγίζουν το λογάριθμο της κανονικής κατανομής.

Η μέτρηση και του μήκους, και της διαμέτρου είναι και επίπονη και χρονοβόρος, αλλά εάν μετρηθούν μόνον οι ίνες που εφάπτονται με μια απειροστού πάχους γραμμή σε ένα οπτικό πεδίο ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM), τότε η πιθανότητα επιλογής μιας δεδομένης ίνας είναι ανάλογη με το μήκος της. Δεδομένου ότι, με τον τρόπο αυτό, το μήκος συνεκτιμάται στους υπολογισμούς στάθμισης ως προς το μήκος, η μόνη μέτρηση που απαιτείται είναι της διαμέτρου, οπότε είναι δυνατόν να υπολογιστεί η τιμή ΣΜΓΜΔ-(2 × Τυπικό σφάλμα), όπως περιγράφεται.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Σωματίδιο: σόμα με λόγο μήκους προς πλάτος μικρότερο από 3:1.

Ίνα: σόμα με λόγο μήκους προς πλάτος (λόγος όψεως) τουλάχιστον 3:1.

1.3. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η μέθοδος έχει σχεδιαστεί για την εξέταση κατανομών διαμέτρου στις περιπτώσεις όπου η διάμεσος των διαμέτρων κυμαίνεται από 0,5 μm έως 6 μm. Μεγαλύτερες διάμετροι μπορούν να μετρηθούν με μικρότερη μεγέθυνση του SEM, ενώ η ισχύς της μεθόδου περιορίζεται για τις κατανομές λεπτότερων ινών. Εάν η διάμεσος των διαμέτρων είναι μικρότερη από 0,5 μm, συνιστάται η μέτρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM).

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Από τον μανδύα ινών ή από ελεύθερες ίνες χύμα λαμβάνονται ορισμένα αντιπροσωπευτικά δείγματα πυρήνα. Το μήκος των ινών χύμα ελαττώνεται με διαδικασία σύνθλιψης και σχηματίζεται κολλοειδές διάλυμα αντιπροσωπευτικού μερικού δείγματος σε νερό. Λαμβάνονται κατάλληλες ποσότητες, διηθούνται με ηθμό από πολυανθρακικό πολυμερές με μέγεθος πόρων 0,2 μm και παρασκευάζεται δοκίμιο για εξέταση με τεχνικές ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). Οι διάμετροι των ινών μετριοούνται με μεγέθυνση οθόνης ×10 000 ή μεγαλύτερη ⁽¹⁾ με χρήση μεθόδου τομής με οριζόντια γραμμή για την αμερόληπτη εκτίμηση της διαμέσου των διαμέτρων. Υπολογίζεται το κατώτερο διάστημα εμπιστοσύνης 95 % (με βάση μονόπλευρη δοκιμή) για να εκτιμηθεί η χαμηλότερη τιμή του γεωμετρικού μέσου των διαμέτρων των ινών του υλικού.

(¹) Αυτή η τιμή μεγέθυνσης υποδεικνύεται για ίνες 3 μm, ενώ στην περίπτωση των ινών 6 μm μπορεί να ενδείκνυται περισσότερο η μεγέθυνση ×5 000.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.5.1. Ασφάλεια/Προφυλάξεις

Θα πρέπει να ελαχιστοποιείται η έκθεση ατόμων σε αερόφερτες ίνες και να χρησιμοποιείται απαγωγός εστία ή συσκευή με χειριστήρια (glove box) για τις εργασίες με ξηρές ίνες. Θα πρέπει να παρακολουθείται κατά περιόδους η έκθεση των ατόμων για να διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα των μεθόδων ελέγχου. Οι εργασίες με ΤΟΡΙ θα πρέπει να εκτελούνται με γάντια μιας χρήσης για τον περιορισμό του ερεθισμού του δέρματος και την αποτροπή της έμμεσης μόλυνσης.

1.5.2. Όργανα/έξοπλισμός

- Πιεστήριο (πρέσα) και μήτρες (ικανό να αποδίδει 10 MPa)
- Τριχοειδείς πορώδεις ηθμοί από πολυανθρακικό πολυμερές με μέγεθος πόρων 0,2 μm (διάμετρος 25 mm)
- Διηθητική μεμβράνη από εστέρα κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 5 μm, προοριζόμενη να χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτικός ηθμός
- Γυάλινη συσκευή διήθησης (ή συστήματα διήθησης μίας χρήσης), ικανή να δέχεται ηθμούς διαμέτρου 25 mm (π.χ. γυάλινο kit μικροανάλυσης Millipore, τύπος XX10 025 00)
- Πρόσφατα απεσταγμένο νερό, που έχει διηθηθεί με ηθμό με μέγεθος πόρων 0,2 μm για την απαλλαγή του από μικροοργανισμούς
- Συσκευή εναπόθεσης υλικού με κονιορτοποίηση (sputter coater) με στόχο χρυσού ή χρυσού/παλλαδίου
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με διακριτική ικανότητα 10 nm και ικανότητα λειτουργίας με μεγέθυνση × 10 000
- Διάφορα: σπαθίδες (σπάτουλες), λεπίδα νυστεριού τύπου 24, λαβίδες, σωλήνες SEM, κόλλα ή κολλητική ταινία άνθρακα, κολλοειδής άργυρος
- Καθετήρας υπερήχων ή επιτραπέζιο λουτρό υπερήχων
- Πυρηνολήπτης ή φελλοτρυπητήρας για τη λήψη δειγμάτων πυρήνα από μανδύες ΤΟΡΙ

1.5.3. Διαδικασία δοκιμής

1.5.3.1. Δειγματοληψία

Για τους μανδύες και τα πλήγματα χρησιμοποιείται πυρηνολήπτης ή φελλοτρυπητήρας των 25 mm, προκειμένου να συλλεγούν δείγματα της ενεργού διατομής. Τα εν λόγω δείγματα θα πρέπει να είναι κατανεμημένα ισομερώς σε όλο το πλάτος ενός μικρού μήκους του μανδύα ή να λαμβάνονται από τυχαία σημεία, εάν είναι διαθέσιμα μεγάλα μήκη του μανδύα. Ο ίδιος εξοπλισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόσπαση τυχαίων δειγμάτων από ελεύθερες ίνες. Εφόσον είναι εφικτό, θα πρέπει να λαμβάνονται έξι δείγματα για να αντιπροσωπεύουν τις χωρικές διακυμάνσεις του χύμα υλικού.

Τα έξι δείγματα πυρήνα θα πρέπει να συνθλίβονται μέσα σε μήτρα διαμέτρου 50 mm με την άσκηση πίεσης 10 MPa. Το υλικό αναμειγνύεται με σπαθίδα, συμπιέζεται εκ νέου με 10 MPa και, κατόπιν, απομακρύνεται από τη μήτρα και φυλάσσεται σε σφραγισμένη γυάλινη φιάλη.

1.5.3.2. Παρασκευή δοκιμίου

Εάν είναι απαραίτητο, το οργανικό συνδετικό μέσο μπορεί να αφαιρεθεί με θέρμανση των ινών σε κλίβανο στους 450 °C για μία ώρα περίπου.

Το δείγμα χωρίζεται σε μερίδια με αποκοπή τεταρτημορίων κύκλου (η εργασία αυτή θα πρέπει να εκτελείται σε απαγωγό εστία).

Με τη βοήθεια σπαθίδας, προστίθεται μια μικρή ποσότητα (< 0,5 g) δείγματος σε 100 ml πρόσφατα απεσταγμένου νερού, το οποίο έχει διηθηθεί με διηθητική μεμβράνη των 0,2 μm (μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές πηγές εξαιρετικά καθαρού νερού, εάν είναι αποδεδειγμένα ικανοποιητικές). Το δείγμα διασπείρεται πλήρως με τη βοήθεια καθετήρα υπερήχων, που λειτουργεί σε ισχύ 100 W και είναι ρυθμισμένος έτσι ώστε να επιτυγχάνει σπηλαιώση. (Εάν δεν διατίθεται καθετήρας, εφαρμόζεται η εξής μέθοδος: επανειλημμένη ανακίνηση και αναστροφή για 30 δευτερόλεπτα, τοποθέτηση σε επιτραπέζιο λουτρό υπερήχων για πέντε λεπτά και επανειλημμένη ανακίνηση και αναστροφή για 30 δευτερόλεπτα ακόμη).

Αμέσως μετά τη διασπορά των ινών, λαμβάνονται κατάλληλες ποσότητες (π.χ. τρεις ποσότητες 3, 6 και 10 ml) με σιφόνιο με ευρύ στόμιο (χωρητικότητας 2-5 ml).

Κάθε κατάλληλη ποσότητα διηθείται υπό κενό με ηθμό από πολυανθρακικό πολυμερές των 0,2 μm, τοποθετημένο μέσα σε διηθητική μεμβράνη από εστέρα κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 5 μm, σε γυάλινη χοάνη διήθησης με κυλινδρικό υποδοχέα. Στη χοάνη θα πρέπει να φέρονται περίπου 5 ml διηθημένου απεσταγμένου νερού και η κατάλληλη ποσότητα να εισάγεται στο νερό με αργή αναρρόφηση, διατηρώντας το ρύγχος του σιφονίου κάτω από το μηνίσκο. Το σιφόνιο και ο υποδοχέας πρέπει να εκπλύνονται σχολαστικά μετά την αναρρόφηση, δεδομένου ότι οι λεπτές ίνες τείνουν να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια.

Ο ηθμός απομακρύνεται με προσοχή και χωρίζεται από τον ενισχυτικό ηθμό, πριν τοποθετηθεί σε δοχείο για να ξηρανθεί.

Από το ίζημα της διήθησης αποκόπτεται με λεπίδα νυστεριού τύπου 24 ένα τμήμα που αντιστοιχεί σε ένα τέταρτο ή στο ήμισυ του ηθμού, με παλινδρομική κίνηση. Το κομμένο τμήμα στερεώνεται με προσοχή σε στηρίγμα δοκιμίου (stub) του SEM με τη βοήθεια κολλητικής ταινίας άνθρακα ή κόλλας άνθρακα. Για τη βελτίωση της ηλεκτρικής επαφής στα άκρα του ηθμού και του στηρίγματος, θα πρέπει να τοποθετείται κolloειδής άργυρος σε τρεις τουλάχιστον θέσεις. Αφού στεγνώσουν η κόλλα και ο κolloειδής άργυρος, η επιφάνεια το ιζήματος επικαλύπτεται με ένα στρώμα χρυσού ή χρυσού/παλλαδίου πάχους περίπου 50 nm με την ειδική συσκευή.

1.5.3.3. Βαθμονόμηση και λειτουργία του SEM

1.5.3.3.1. Βαθμονόμηση

Η βαθμονόμηση του SEM θα πρέπει να ελέγχεται τουλάχιστον ανά εβδομάδα (θεωρητικά, καθημερινά) με πιστοποιημένο κανάβο βαθμονόμησης. Η βαθμονόμηση θα πρέπει να συγκρίνεται με πιστοποιημένο πρότυπο και εάν η μετρηθείσα τιμή (SEM) δεν περικλείεται εντός των ορίων $\pm 2\%$ της πιστοποιημένης τιμής, πρέπει να ρυθμίζεται το SEM και να επανελέγχεται η βαθμονόμηση.

Το SEM θα πρέπει να είναι ικανό να διακρίνει τουλάχιστον μια ελάχιστη ορατή διάμετρο 0,2 μm σε πραγματικό βασικό υλικό δείγματος με μεγέθυνση $\times 2\,000$.

1.5.3.3.2. Λειτουργία

Το SEM θα πρέπει να λειτουργεί με μεγέθυνση $\times 10\,000$ ⁽¹⁾ σε συνθήκες που εξασφαλίζουν ικανοποιητική διακριτική ικανότητα με αποδεκτή εικόνα σε χαμηλές ταχύτητες σάρωσης της τάξεως, λόγω χάριν, των 5 δευτερολέπτων ανά πλαίσιο. Αν και οι απαιτήσεις λειτουργίας των διαφόρων SEM μπορεί να ποικίλλουν, για να επιτευχθεί γενικά η καλύτερη δυνατή ορατότητα και διακριτική ικανότητα, όταν εξετάζονται υλικά σχετικά μικρού ατομικού βάρους, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επιταχυντικά δυναμικά των 5-10 keV με ρύθμιση μικρής κηλίδας και μικρή απόσταση εργασίας. Κατά τη γραμμική όδευση θα πρέπει να χρησιμοποιείται κλίση 0° για την ελαχιστοποίηση της επανεστίασης ή, εφόσον το SEM διαθέτει ευκεντρωμένο (eucentric) αντικειμενικό σύστημα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ευκεντρωτική απόσταση εργασίας. Εάν το υλικό δεν περιέχει ίνες μικρής διαμέτρου και οι διάμετροι των ινών είναι μεγάλες ($> 5\ \mu\text{m}$), μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερη μεγέθυνση.

1.5.3.4. Προσδιορισμός του μεγέθους

1.5.3.4.1. Εξέταση με μικρή μεγέθυνση για την αξιολόγηση του δοκιμίου

Το δοκίμιο θα πρέπει πρώτα να εξετάζεται με μικρή μεγέθυνση για να διαπιστωθεί αν έχουν σχηματιστεί τολύπες μεγάλων ινών και να εκτιμηθεί η πυκνότητα των ινών. Σε περίπτωση υπέρμετρου σχηματισμού τολυπών, συνιστάται η παρασκευή νέου δοκιμίου.

Για λόγους στατιστικής ακρίβειας, είναι απαραίτητη η μέτρηση ενός ελάχιστου αριθμού ινών και η μεγάλη πυκνότητα ινών μπορεί να φαίνεται επιθυμητή, δεδομένου ότι η εξέταση κενών πεδίων είναι χρονοβόρος και δεν εξυπηρετεί την ανάλυση. Εν τούτοις, η υπερφόρτωση του ηθμού δυσχεραίνει τη μέτρηση του συνόλου των μετρήσιμων ινών και ενέχει τον κίνδυνο να παραλειφθούν οι μικρές ίνες, επειδή μπορεί να σκιάζονται από τις μεγάλες.

Πυκνότητες μεγαλύτερες από 150 ίνες ανά χιλιοστόμετρο γραμμικής όδευσης ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα συστηματικού σφάλματος την υπερεκτίμηση της ΣΜΓΜΔ. Από την άλλη πλευρά, οι χαμηλές συγκεντρώσεις ινών αυξάνουν το χρόνο που απαιτείται για την ανάλυση· για το λόγο αυτό, συχνά είναι οικονομικά αποδοτικότερη η παρασκευή δοκιμίου με πυκνότητα ινών που να προσεγγίζει το άριστο αντί της εμμονής στη μέτρηση ιζημάτων χαμηλής συγκέντρωσης. Η βέλτιστη πυκνότητα ινών θα πρέπει να δίδει κατά μέσον όρο μία ή δύο μετρήσιμες ίνες ανά οπτικό πεδίο σε μεγέθυνση $\times 5\,000$. Ωστόσο, η βέλτιστη πυκνότητα εξαρτάται από το μέγεθος (διάμετρος) των ινών και, συνεπώς, είναι απαραίτητο να απευθυνθεί ο τεχνικός σε εμπειρογνώμονα, πριν κρίνει κατά πόσον η πυκνότητα ινών προσεγγίζει το άριστο.

(¹) Για τις ίνες 3 μm, βλ. επεξεργασμένη υποσημείωση.

1.5.3.4.2. Στάθμιση των διαμέτρων των ινών ως προς το μήκος

Μετριοúνται μόνον οι ίνες που εφάπτονται (ή τέμνονται) με μια λεπτή (απειροστού πάχους) γραμμή, που χαράσσεται στην οδόνθη του SEM. Για το λόγο αυτό, χαράσσεται οριζόντια (ή κάθετη) γραμμή, διερχόμενη από το κέντρο της οδόνθης.

Εναλλακτική δυνατότητα είναι η τοποθέτηση ενός και μόνο σημείου στο κέντρο της οδόνθης και η συνεχής σάρωση του ηθμού προς μία κατεύθυνση. Μετριέται και καταγράφεται η διάμετρος κάθε ίνας με λόγο όψεως μεγαλύτερο από 3:1, που εφάπτεται ή τέμνεται με το σημείο αυτό.

1.5.3.4.3. Προσδιορισμός του μεγέθους των ινών

Συνιστάται η μέτρηση τουλάχιστον 300 ινών. Κάθε ίνα μετριέται μόνο μία φορά στο σημείο τομής με τη γραμμή ή το σημείο που έχει χαραχθεί στην εικόνα (ή κοντά στο σημείο τομής, εάν τα άκρα της ίνας είναι σκοτεινά). Σε περίπτωση συνάντησης με ίνες που έχουν ανομοιομορφες ενεργούς διατομές, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια μέτρηση αντιπροσωπευτική του μέσου όρου διαμέτρων των ινών. Θα πρέπει να ορίζεται με προσοχή το άκρο και να μετριέται η πιο σύντομη απόσταση ανάμεσα στα άκρα των ινών. Ο προσδιορισμός του μεγέθους μπορεί να εκτελείται απευθείας (on-line) ή μετά την εξέταση των ινών, σε αποθηκευμένες εικόνες ή φωτογραφίες. Συνιστάται η χρήση ημιαυτόματων συστημάτων μέτρησης εικόνων, τα οποία μεταφέρουν τα δεδομένα κατευθείαν σε λογιστικά φύλλα, επειδή με τον τρόπο αυτό εξοικονομείται χρόνος, εκλείπουν τα σφάλματα μεταγραφής και μπορούν να αυτοματοποιηθούν οι υπολογισμοί.

Τα άκρα των ινών μεγάλου μήκους θα πρέπει να ελέγχονται με μικρή μεγέθυνση για να εξακριβώνεται ότι δεν συστρέφονται με αποτέλεσμα να επανέρχονται στο οπτικό πεδίο μέτρησης και ότι μετριοúνται μόνο μία φορά.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι διάμετροι των ινών συνήθως δεν εμφανίζουν κανονική κατανομή. Ωστόσο, είναι δυνατόν να ληφθεί μια κατανομή που προσεγγίζει την κανονική με λογαριθμική μετατροπή.

Υπολογίζονται ο αριθμητικός μέσος (μέση τιμή $\ln D$) και η τυπική απόκλιση ($SD_{\ln D}$) του νεπερίου λογαριθμού των τιμών ($\ln D$) διαμέτρου (D) των n ινών.

$$\text{mean } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

$$SD_{\ln D} = \sqrt{\frac{\sum (\ln D - \text{mean } \ln D)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Η τυπική απόκλιση διαιρούμενη δια της τετραγωνικής ρίζας του αριθμού των μετρήσεων (n) παρέχει το τυπικό σφάλμα ($SE_{\ln D}$).

$$SE_{\ln D} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Αφαιρώντας το διπλάσιο του τυπικού σφάλματος από τον αριθμητικό μέσο και αντικαθιστώντας την τιμή αυτή (μέσος όρος μείον το διπλάσιο του τυπικού σφάλματος) στην ακόλουθη εκθετική σχέση, προκύπτει ο γεωμετρικός μέσος μειωμένος κατά το διπλάσιο του γεωμετρικού τυπικού σφάλματος.

$$\text{ΣΜΓΜΔ} - 2SE = e^{(\text{mean } \ln D - 2SE_{\ln D})} \quad (4)$$

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

- την τιμή ΣΜΓΜΔ-2SE,
- κάθε διαφορά και ιδίως εκείνες που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει την επαναληπτικότητα ή την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, με κατάλληλη αιτιολόγηση.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.
 2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weighted geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division, 1994.
-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

B.46. ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ IN VITRO: ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΟ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΙΣΑΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος «δερματικός ερεθισμός» αναφέρεται στην πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα μετά από εφαρμογή ελεγχόμενης ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών [όπως ορίζεται από το Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών (GHS, από τα αρχικά των λέξεων Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals) των Ηνωμένων Εθνών](1). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει μια διαδικασία in vitro, με την οποία είναι δυνατόν, ανάλογα με τις απαιτούμενες πληροφορίες, να προσδιοριστεί η ερεθιστικότητα ουσιών για το δέρμα ως αυτοτελής δοκιμή υποκατάστασης στο πλαίσιο στρατηγικής δοκιμών με προσέγγιση βασικόμενη στο βάρος της απόδειξης (2).

Η εκτίμηση του δερματικού ερεθισμού αποτελεί τυπική περίπτωση χρήσης πειραματόζωων (βλέπε μέθοδο B.4)(3). Στο πλαίσιο του προβληματισμού για την καλή μεταχείριση των ζώων, η μέθοδος δοκιμών B.4 επιτρέπει τον προσδιορισμό της διάβρωσης/του ερεθισμού του δέρματος με την εφαρμογή στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος), η οποία συνίσταται στη χρήση επικυρωμένων μεθόδων in vitro και ex vivo, έτσι ώστε να αποφεύγονται ο πόνος και η ταλαιπωρία των ζώων. Χρήσιμες για το σχετικό με τη διαβρωτικότητα σκέλος της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών της μεθόδου B.4 είναι τρεις επικυρωμένες μέθοδοι ή κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών in vitro, οι B.40, B.40a και TG 435 (4, 5, 6).

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται σε μοντέλα ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας, ο γενικός σχεδιασμός των οποίων (χρήση επιδερμικών κερατινοκυττάρων ανθρώπινης προέλευσης ως πηγής κυττάρων, αντιπροσωπευτικού ιστού και κυτταρικής αρχιτεκτονικής) μιμείται σε μεγάλο βαθμό τις βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες των ανώτερων στιβάδων του ανθρώπινου δέρματος, δηλαδή της επιδερμίδας. Η διαδικασία που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών επιτρέπει τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ερεθιστικών ουσιών της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει επίσης μια σειρά προτύπων για τις επιδόσεις με σκοπό την αξιολόγηση παρεμφερών και τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών που βασίζονται σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα (7).

Έχουν ολοκληρωθεί μελέτες προεπικύρωσης, βελτιστοποίησης και επικύρωσης για δύο μεθόδους δοκιμών in vitro (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17) με χρήση μοντέλων ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας, οι οποίες κυκλοφορούν στο εμπόριο με τις ονομασίες EriSkin™ και EriDerm™. Οι σχετικές δημοσιεύσεις βασίστηκαν στη φράση κινδύνου R38. Στη δημοσίευση 25 εξετάζονται ορισμένες πτυχές του επανπολογισμού για τους σκοπούς του GHS. Μέθοδοι με επιδόσεις ισοδύναμες με εκείνες της EriSkin™ (1η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς) συνιστώνται ως αυτοτελείς μέθοδοι δοκιμών υποκατάστασης της δοκιμής in vivo σε κουνέλι για την ταξινόμηση ερεθιστικών ουσιών της κατηγορίας 2 του GHS. Μέθοδοι με επιδόσεις ισοδύναμες με εκείνες της EriDerm™ (2η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς) συνιστώνται μόνο ως μέθοδοι δοκιμών διαλογής (screening) ή ως τμήμα στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών με προσέγγιση βασικόμενη στο βάρος της απόδειξης, για την ταξινόμηση ερεθιστικών ουσιών της κατηγορίας 2 του GHS. Πριν από τη χρήση προτεινόμενης δοκιμής δερματικού ερεθισμού in vitro σε μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας για κανονιστικούς σκοπούς, πρέπει να προσδιορίζονται η αξιοπιστία της, η καταλληλότητά της (ορθότητα) και οι περιορισμοί της προτεινόμενης χρήσης της, σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων που παρατίθενται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (προσάρτημα), ώστε να εξασφαλίζεται ότι οι παράμετροι αυτές είναι συγκρίσιμες με εκείνες της 1ης επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς.

Έχουν επικυρωθεί, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της παρούσας μεθόδου δοκιμών, δύο ακόμη μέθοδοι δοκιμών in vitro σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα, οι οποίες αποδίδουν αποτελέσματα παραπλήσια με της 1ης επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς (18). Πρόκειται για την τροποποιημένη μέθοδο δοκιμών EriDerm™ (2η τροποποιημένη μέθοδος αναφοράς) και τη μέθοδο δοκιμών SkinEthic RHE™ [1η παρεμφερής (me-too) μέθοδος].

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Για την παρούσα μέθοδο δοκιμών ισχύουν οι ακόλουθοι ορισμοί:

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών.

Ουσία έλεγχου παρτίδων: Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης που προκαλεί μεσαία απόκριση κυτταρικής βιωσιμότητας του ιστού.

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού, π.χ. ως ικανότητα των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών να ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης ΜΤΤ [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλθθειαιζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, μπλε του θειαζολυλίου], η οποία, ανάλογα με το μετρούμενο τελικό σημείο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με τον συνολικό αριθμό ή/και την ζωτικότητα των κυττάρων.

ET₅₀: ο χρόνος έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας-δείκτη, βλέπε επίσης IC₅₀.

Ψευδοαρνητικό ποσοστό: το ποσοστό του συνόλου των θετικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως αρνητικές από μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί δείκτη των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Ψευδοθετικό ποσοστό: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών (μη δραστικών) ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως θετικές. Αποτελεί δείκτη επίδοσης της μεθόδου δοκιμών.

Άπειρη δόση: ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας που εφαρμόζεται στο δέρμα και υπερβαίνει την απαιτούμενη για την πλήρη και ομοιόμορφη κάλυψη της δερματικής επιφάνειας.

GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals/Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των ουσιών και μειγμάτων με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων, με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και παρόχων βοήθειας σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης) και του περιβάλλοντος (1). Το σύστημα αυτό εφαρμόζεται στην ΕΕ μέσω του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1272/2008.

IC₅₀: η συγκέντρωση στην οποία μια ουσία-δείκτης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, βλέπε επίσης ET₅₀.

Πρότυπα επίδοσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επίδοσης περιλαμβάνουν I) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, II) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη της αποδεκτής επίδοσης της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και III) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών, όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελάχιστων ουσιών αναφοράς.

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών είναι δυνατόν να εφαρμοστεί διαχρονικά με αναπαραγωγιμότητα εντός του ίδιου εργαστηρίου και μεταξύ εργαστηρίων, τα οποία χρησιμοποιούν το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών ουσιών που ταξινομούνται ορθώς από τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας μιας μεθόδου δοκιμών με την οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών ουσιών που ταξινομούνται ορθώς από τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας μιας μεθόδου δοκιμών με την οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών.

Δερματικός ερεθισμός: η πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα μετά την εφαρμογή ελεγχόμενης ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Ο δερματικός ερεθισμός είναι τοπική, μη ανοσογονική αντίδραση που εμφανίζεται σε σύντομο χρόνο μετά τη διέγερση (24). Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι πρόκειται για αναστρέψιμη διαδικασία που περιλαμβάνει φλεγμονώδεις αντιδράσεις και τα περισσότερα κλινικά συμπτώματα ερεθισμού (ερύθημα, οίδημα, κνησμό και πόνο) που συνδέονται με φλεγμονή.

1.3. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Οι δοκιμές σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα που εντάσσονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών υπόκεινται στον περιορισμό ότι με αυτές ταξινομούνται ουσίες ως ερεθιστικές για το δέρμα μόνο όσον αφορά την κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Επειδή οι δοκιμές αυτές δεν επιτρέπουν την κατάταξη ουσιών στην προαιρετική κατηγορία 3, όπως αυτή ορίζεται στο GHS των Ηνωμένων Εθνών, όλες οι υπόλοιπες ουσίες δεν ταξινομούνται (καμία κατηγορία). Ανάλογα με τις ανάγκες των κανονιστικών ρυθμίσεων και την πιθανή μελλοντική προσθήκη νέων τελικών σημείων, βελτίωση ή ανάπτυξη νέων δοκιμών me-toο, ενδέχεται να χρειαστεί αναθεώρηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών επιτρέπει τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας μονοσυστατων ερεθιστικών ουσιών (19), δεν παρέχει όμως επαρκή πληροφόρηση για τη διάβρωση του δέρματος. Δεν είναι δυνατός ο έλεγχος αερίων και αερολυμάτων (αεροζόλ), ενώ η αξιολόγηση των μειγμάτων δεν έχει ακόμη αποτελέσει αντικείμενο μελέτης επικύρωσης.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η ελεγχόμενη ουσία εφαρμόζεται τοπικά σε τρισδιάστατο μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας, το οποίο αποτελείται από φυσιολογικά επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης που έχουν καλλιιεργηθεί ώστε να σχηματίσουν μοντέλο της ανθρώπινης επιδερμίδας με επαλληλία στιβάδων υψηλής διαφοροποίησης. Το μοντέλο αυτό συνίσταται από τις εξής οργανωμένες στιβάδες: βασική, ακανθώδη και κοκκώδη, καθώς και από πολυστρωματική κεράτινη στιβάδα που περιέχει μεσοκυττάρια φολιδωτά στρώματα λιπιδίων, των οποίων η διάταξη είναι ανάλογη με εκείνη που συναντάται *in vivo*.

Η αρχή της δοκιμής σε μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας βασίζεται στην παραδοχή ότι οι ερεθιστικές ουσίες είναι ικανές να διεισδύουν στην κεράτινη στιβάδα με διάχυση και είναι κυτταροτοξικές για τα κύτταρα των υποκείμενων στιβάδων. Η κυτταρική βιωσιμότητα μετράται με τη μετατροπή της χρωστικής ζώτικης χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, μπλε του θειαζολυλίου, αριθ. EINECS: 206-069-5, αριθ. CAS: 298-93-1] υπό την επίδραση αφυδρογονάσης σε μπλε άλας φορμαζάνης, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μετά την εκχύλιση του από τους ιστούς (20). Οι ερεθιστικές ουσίες αναγνωρίζονται από την ικανότητά τους να μειώνουν την κυτταρική βιωσιμότητα σε επίπεδα χαμηλότερα από καθορισμένο κατώτατο όριο (δηλαδή $\leq 50\%$, στην περίπτωση των ερεθιστικών ουσιών της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών). Οι ουσίες που έχουν ως αποτέλεσμα να υπερβαίνει η κυτταρική βιωσιμότητα το καθορισμένο κατώτατο όριο δεν ταξινομούνται (δηλαδή $> 50\%$ συνεπάγεται «καμία κατηγορία»).

Τα συστήματα μοντέλων ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο στερεών, υγρών, ημιστερεών και κηρών. Τα υγρά μπορούν να είναι υδατικά ή μη, ενώ τα στερεά μπορούν να είναι διαλυτά ή αδιάλυτα στο νερό. Τα στερεά θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να ελέγχονται σε μορφή λεπτής σκόνης. Δεδομένου ότι στην επικύρωση των συστημάτων δοκιμών σε μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας συμπεριελήφθησαν 58 επιμελώς επιλεγμένες ουσίες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν ευρύ φάσμα κατηγοριών χημικών προϊόντων, αναμένεται ότι οι μέθοδοι θα μπορούν κατά κανόνα να εφαρμοστούν σε όλα τα χημικά προϊόντα (16). Η επικύρωση καλύπτει 13 ερεθιστικές ουσίες της κατηγορίας 2 του GHS. Σημειώτεον ότι στην επικύρωση δεν συμπεριελήφθησαν μη διαβρωτικά οξέα, βάσεις, άλατα και άλλες ανόργανες ουσίες, ενώ ορισμένες γνωστές κατηγορίες οργανικών ερεθιστικών ουσιών, όπως τα υδροϋπεροξειδία, οι φαινόλες και οι επιφανειοδραστικές ουσίες, είτε δεν συμπεριελήφθησαν καθόλου είτε συμπεριελήφθησαν σε περιορισμένο βαθμό.

1.5. ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική μια επικυρωμένη μέθοδο που συμφωνεί με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια μπορεί να επιθυμούν να αποδείξουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις συνιστώμενες δέκα ουσίες που εμφανίζονται στον πίνακα 1. Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η προαιρετική κατηγορία 3 του GHS των Ηνωμένων Εθνών θεωρείται ως μη υφιστάμενη. Σε περίπτωση ανάπτυξης νέων, παρεμφερών (me-too) μεθόδων δοκιμών βάσει της παρούσας μεθόδου, οι οποίες είναι δομικά και λειτουργικά ομοειδείς με τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, ή σε περίπτωση τροποποίησης επικυρωμένων μεθόδων, πριν από τη χρήση της νέας μεθόδου δοκιμών για δοκιμές κανονιστικών ρυθμίσεων, πρέπει να εφαρμόζονται τα πρότυπα επιδόσεων που παρατίθενται στο προσάρτημα της παρούσας μεθόδου δοκιμών για να αποδεικνύεται ότι αυτή παρουσιάζει συγκρίσιμη αξιοπιστία και ορθότητα.

Πίνακας 1

Ουσίες για την απόδειξη ικανότητας, οι οποίες αποτελούν υποσύνολο των ουσιών αναφοράς που απαριθμούνται στο προσάρτημα

Ουσία	Αριθμός CAS	Βαθμολογία σε δοκιμές <i>in vivo</i>	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία του GHS
ναφθαλινοξικό οξύ	86-87-3	0	Σ(τερεό)	Καμία
ισοπροπανόλη	67-63-0	0,3	Υ(γρό)	Καμία
στεατικό μεθύλιο	112-61-8	1	Σ	Καμία
βουτυρικό επτύλιο	5870-93-9	1,7	Υ	Προαιρετική κατηγορία 3
σαλικυλικό εξύλιο	6259-76-3	2	Υ	Προαιρετική κατηγορία 3
κυκλαμιναλδεύδη	103-95-7	2,3	Υ	Κατηγορία 2
1-βρωμοεξάνιο	111-25-1	2,7	Υ	Κατηγορία 2
μεθακρυλικό βουτύλιο	97-88-1	3	Υ	Κατηγορία 2
1-μεθυλο-3-φαινυλο-1-πιπεραζίνη	5271-27-2	3,3	Σ	Κατηγορία 2
επτανάλη	111-71-7	4	Υ	Κατηγορία 2

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα στοιχεία και οι διαδικασίες μιας μεθόδου δοκιμών σε μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας για την εκτίμηση του δερματικού ερεθισμού. Το μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας είναι δυνατόν να κατασκευαστεί, να παρασκευαστεί ή να ληφθεί από το εμπόριο (π.χ. EpiSkin™, EpiDerm™ και SkinEthic RHE™). Πρότυπα πρωτόκολλα δοκιμών για τα μοντέλα EpiSkin™, EpiDerm™ και SkinEthic RHE™ είναι διαθέσιμα στο Διαδίκτυο, στη διεύθυνση [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>] (21, 22, 23). Οι δοκιμές θα πρέπει να διεξάγονται ως εξής:

1.6.1. Στοιχεία του μοντέλου ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας

1.6.1.1. Γενικοί όροι για το μοντέλο

Πρέπει να χρησιμοποιούνται φυσιολογικά ανθρώπινα κερατινοκύτταρα για την κατασκευή του επιθηλίου. Πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων (βασική, ακανθώδης, κοκκώδης) κάτω από μία λειτουργική κεράτινη στιβάδα. Η κεράτινη στιβάδα πρέπει να είναι πολυστρωματική και να διαθέτει τα αναγκαία λιπιδικά χαρακτηριστικά, ώστε να δημιουργεί στέρεο λειτουργικό φραγμό, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών ουσιών-δεικτών, π.χ. δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) ή Triton X-100. Η λειτουργία φραγμού είναι δυνατόν να εκτιμηθεί με προσδιορισμό είτε της συγκέντρωσης στην οποία μια ουσία-δείκτης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC₅₀) μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης είτε του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % (ET₅₀) μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας-δείκτη. Οι ιδιότητες συγκράτησης του μοντέλου πρέπει να αποτρέπουν την παράκαμψη της κεράτινης στιβάδας από το υλικό και την είσοδο του στον βιώσιμο ιστό, η οποία θα συνεπαγόταν ατελή μοντελοποίηση της έκθεσης του δέρματος. Το μοντέλο δέρματος πρέπει να μην έχει μολυνθεί με βακτηρίδια, ιούς, μυκόπλασμα ή μύκητες.

1.6.1.2. Λειτουργικοί όροι για το μοντέλο

1.6.1.2.1. Βιωσιμότητα

Η δοκιμασία που προτιμάται για τον προσδιορισμό της τάξης μεγέθους της βιωσιμότητας είναι η ΜΤΓ (20). Η οπτική πυκνότητα (OD) της χρωστικής που εκχυλίζεται (διαλύεται) από τον ιστό ο οποίος έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 20πλάσια της OD του διαλύτη εκχύλισης. Πρέπει να τεκμηριώνεται ότι ο ιστός που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα είναι σταθερός σε καλλιέργεια (παρέχει παρόμοιες μετρήσεις βιωσιμότητας) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης που προβλέπεται στη δοκιμή.

1.6.1.2.2. Λειτουργία φραγμού

Η κεράτινη στιβάδα και η λιπιδική της σύσταση πρέπει να ανθίστανται επαρκώς στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών ουσιών-δεικτών, π.χ. SDS ή Triton X-100, όπως εκτιμάται με τη βοήθεια της τιμής IC₅₀ ή ET₅₀.

1.6.1.2.3. Μορφολογία

Κατάλληλα ειδικευμένο προσωπικό πρέπει να εκτελεί ιστολογική εξέταση του ανασυσταθέντος δέρματος/επιδερμίδας, από την οποία πρέπει να προκύπτει δομή όμοια με εκείνη του ανθρώπινου δέρματος/επιδερμίδας (συμπεριλαμβανομένης της ύπαρξης πολυστρωματικής κεράτινης στιβάδας).

1.6.1.2.4. Αναπαραγωγιμότητα

Πρέπει να αποδεικνύεται η διαχρονική αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων της εφαρμογής της μεθόδου σε συγκεκριμένο μοντέλο, κατά προτίμηση με τη βοήθεια κατάλληλης ουσίας ελέγχου παρτίδων (συγκριτικής αξιολόγησης) (βλέπε προσάρτημα).

1.6.1.2.5. Ποιοτικοί έλεγχοι του μοντέλου

Κάθε παρτίδα του χρησιμοποιούμενου μοντέλου επιδερμίδας πρέπει να ανταποκρίνεται σε καθορισμένα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι εκείνα που αφορούν τη βιωσιμότητα (σημείο 1.6.1.2.1) και τη λειτουργία φραγμού (σημείο 1.6.1.2.2). Ο προμηθευτής του δερματικού μοντέλου (ή, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται μοντέλο εσωτερικής κατασκευής, ο ερευνητής) πρέπει να καθορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για την IC₅₀ ή τον ET₅₀. Οι ιδιότητες φραγμού των ιστών πρέπει να ελέγχονται από το εργαστήριο μετά την παραλαβή τους. Δεκτά για την αξιόπιστη πρόγνωση των ερεθιστικών επιδράσεων μπορούν να γίνουν μόνο αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με ιστούς οι οποίοι πληρούν τα κριτήρια. Κατωτέρω παρατίθενται, ενδεικτικά, τα πεδία τιμών αποδοχής για τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς.

Πίνακας 2

Παραδείγματα κριτηρίων αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής για τους ποιοτικούς ελέγχους

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Μέση τιμή του πεδίου τιμών αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
1η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς (αγωγή 18 ωρών με SDS)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 2,32 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
2η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς (1 % Triton X-100)	ET ₅₀ = 4,8 ώρες	ET ₅₀ = 6,7 ώρες	ET ₅₀ = 8,7 ώρες

1.6.1.3. Εφαρμογή των ελεγχόμενων ουσιών και των ουσιών-μαρτύρων

Πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για την επανάληψη κάθε αγωγής και της εφαρμογής των ουσιών-μαρτύρων (τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις κάθε μέτρησης). Προκειμένου τόσο για υγρές όσο και για στερεές ουσίες, πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας ώστε να καλύπτεται ομοιόμορφα η δερματική επιφάνεια και, ταυτόχρονα, να αποφεύγονται οι άπειρες δόσεις (βλέπε σημείο 1.2 «Ορισμοί»), δηλαδή πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον $25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ή $25 \text{ mg}/\text{cm}^2$. Στην περίπτωση των στερεών ουσιών, η επιφάνεια της επιδερμίδας πρέπει να υγραίνεται με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό πριν από την εφαρμογή, ώστε να εξασφαλίζεται καλή επαφή με το δέρμα. Τα στερεά θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να ελέγχονται σε μορφή λεπτής σκόνης. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να εκπλύνεται επιμελώς από τη δερματική επιφάνεια με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ή με διάλυμα NaCl 0,9 %. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας, η περίοδος έκθεσης μπορεί να κυμαίνεται από 15 έως 60 λεπτά και η θερμοκρασία επώασης από 20 έως 37 °C. Για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε τις πρότυπες λειτουργικές διαδικασίες (Standard Operating Procedures) των τριών μεθόδων (21, 22, 23).

Σε κάθε μελέτη πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλοι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες για να αποδεικνύεται ότι η βιωσιμότητα (αρνητικός μάρτυρας), η λειτουργία φραγμού και η συνακόλουθη ευαισθησία των ιστών (θετικός μάρτυρας) περικλείονται εντός καθορισμένου ιστορικού πεδίου τιμών. Η συνιστώμενη ως θετικός μάρτυρας ουσία είναι υδατικό διάλυμα SDS 5 %. Η συνιστώμενη ως αρνητικός μάρτυρας ουσία είναι το νερό ή φυσιολογικός ορός στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS).

1.6.1.4. Μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας

Το σημαντικότερο στοιχείο της διαδικασίας δοκιμών είναι η μέτρηση της βιωσιμότητας όχι αμέσως μετά την έκθεση στις ελεγχόμενες ουσίες, αλλά αφού προηγηθεί επώαση των εκπλυθέντων ιστών σε πρόσφατο θρεπτικό υλικό για αρκούτως μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την αγωγή. Το χρονικό αυτό διάστημα επιτρέπει τόσο την ανάκτηση από ασθενείς ερεθιστικές επιδράσεις, όσο και την εκδήλωση σαφών κυτταροτοξικών επιδράσεων. Κατά τη διάρκεια του σταδίου βελτιστοποίησης της δοκιμής (9, 10, 11, 12, 13), αποδείχθηκε ότι ο βέλτιστος χρόνος επώασης μετά την αγωγή είναι 42 ώρες και, ως εκ τούτου, αυτός χρησιμοποιήθηκε στην επικύρωση των μεθόδων αναφοράς για τις δοκιμές.

Η δοκιμασία μετατροπής της MTT αποτελεί επικυρωμένη ποσοτική μέθοδο, η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, ενώ είναι συμβατή με τη χρήση σε τριδιάστατο ιστικό μόρφωμα. Το δερματικό δείγμα φέρεται σε διάλυμα MTT κατάλληλης συγκέντρωσης (π.χ. 0,3-1 mg/mL), όπου αφήνεται να παραμείνει επί τριώρο. Στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο μπλε ίζημα φορμαζάνης εκχυλίζεται από τον ιστό με διαλύτη (π.χ. ισοπροπανόλη, όξινο διάλυμα ισοπροπανόλης) και μετράται η συγκέντρωση της φορμαζάνης με προσδιορισμό της OD σε μήκος κύματος 570 nm, με μέγιστη διάβαση ζώνης $\pm 30 \text{ nm}$.

Οι οπτικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας ή η χημική της δράση επί της MTT ενδέχεται να παρεμποδίσουν τη δοκιμασία, με αποτέλεσμα εσφαλμένη εκτίμηση της βιωσιμότητας (επειδή η ελεγχόμενη ουσία μπορεί εξίσου να παρεμποδίζει ή να αναστρέφει τον σχηματισμό του χρώματος, όπως και να τον προκαλέσει). Αυτό μπορεί να συμβεί όταν μια συγκεκριμένη ελεγχόμενη ουσία δεν απομακρυνθεί τελείως από το δέρμα με την έκπλυση ή διεισδύσει στην επιδερμίδα. Εάν η ελεγχόμενη ουσία δρα απευθείας επί της MTT ή είναι εκ φύσεως έγχρωμη ή χρωματίζεται κατά την αγωγή του ιστού, πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες για την ανίχνευση και διόρθωση της παρεμπόδισης της τεχνικής μέτρησης της βιωσιμότητας από την ελεγχόμενη ουσία. Ο τρόπος ελέγχου της άμεσης αναγωγής της MTT περιγράφεται λεπτομερώς στο πρωτόκολλο δοκιμής των επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς (21, 22, 23). Η μη ειδική εμφάνιση χρώματος (NSC) εξαιτίας αυτής της παρεμπόδισης δεν πρέπει να υπερβαίνει το 30 % της τιμής του αρνητικού μάρτυρα (για τις διορθώσεις). Εάν NSC > 30 %, η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται ασύμβατη με τη δοκιμή.

1.6.1.5. Κριτήρια αποδοχής της δοκιμασίας

Για κάθε δοκιμασία στην οποία χρησιμοποιούνται έγκυρες παρτίδες (βλέπε σημείο 1.6.1.2.5), η OD των ιστών που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα πρέπει να αντιστοιχεί στην ποιότητα των ιστών στους οποίους εφαρμόστηκαν όλα τα στάδια της αποστολής και παραλαβής και το σύνολο του πρωτοκόλλου της δοκιμής ερεθισμού. Οι τιμές OD των μαρτύρων δεν πρέπει να είναι χαμηλότερες από τα καθορισμένα ιστορικά κατώτερα όρια. Ομοίως, οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον θετικό μάρτυρα, δηλαδή με υδατικό διάλυμα SDS 5 %, πρέπει να εκδηλώνουν την ευαισθησία που διατηρούν και την οικεία ικανότητα απόκρισης σε ερεθιστική ουσία υπό τις συνθήκες κάθε επιμέρους δοκιμασίας (π.χ. βιωσιμότητα $\leq 40 \%$ για την 1η επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς και $\leq 20 \%$ για την 2η επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς). Πρέπει να καθορίζονται τα κατάλληλα σχετικά μέτρα μεταβλητότητας μεταξύ των δειγμάτων ιστών των επαναλήψεων (π.χ. εάν χρησιμοποιείται η τυπική απόκλιση, η τιμή της θα πρέπει να είναι < 18 %).

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Για κάθε αγωγή, πρέπει να αναφέρονται, σε μορφή πίνακα, τα δεδομένα που προέκυψαν από κάθε επιμέρους δοκίμιο (π.χ. τιμές OD και υπολογισθέν επί τοις εκατό ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας για κάθε ελεγχόμενη ουσία, καθώς και ταξινόμηση), συμπεριλαμβανομένων δεδομένων από επαναληπτικά πειράματα, κατά περίπτωση. Επιπλέον, πρέπει να αναφέρονται, για κάθε δοκιμή, οι μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση. Για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία πρέπει να αναφέρονται οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις με το αντιδραστήριο MTT και να δηλώνεται αν πρόκειται για έγχρωμη ελεγχόμενη ουσία.

2.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι τιμές OD που προκύπτουν για κάθε δοκίμιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του επί τοις εκατό ποσοστού βιωσιμότητας σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος ορίζεται σε 100 %. Η τιμή διαχωρισμού (cut-off value) ποσοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας, η οποία διακρίνει τις ερεθιστικές από τις μη ταξινομούμενες ελεγχόμενες ουσίες, καθώς και η (οι) στατιστική(-ές) διαδικασία(-ες) που χρησιμοποιείται(-ούνται) για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τον χαρακτηρισμό των ερεθιστικών ουσιών, πρέπει να ορίζονται επακριβώς, να τεκμηριώνονται και να είναι αποδεδειγμένα κατάλληλα. Οι τιμές διαχωρισμού για την πρόγνωση του ερεθισμού, που συνδέονται με τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, είναι οι εξής:

Η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται ερεθιστική για το δέρμα και ανήκει στην κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών:

- i) εάν η βιωσιμότητα των ιστών μετά από έκθεση και επώαση μετά την αγωγή είναι μικρότερη ή ίση (\leq) με 50 %.

Θεωρείται ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν κατατάσσεται σε καμία κατηγορία:

- ii) εάν η βιωσιμότητα των ιστών μετά από έκθεση και επώαση μετά την αγωγή είναι μεγαλύτερη ($>$) από 50 %.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία και μάρτυρες:

- χημική(-ές) ονομασία(-ες), όπως κατά IUPAC ή CAS και αριθμός CAS, εφόσον είναι γνωστά,
- καθαρότητα και σύσταση της ουσίας (σε κατά βάρος εκατοστιαία αναλογία),
- φυσικοχημικές ιδιότητες σχετικές με τη διεξαγωγή της μελέτης (π.χ. φυσική κατάσταση, σταθερότητα και πιητικότητα, pH, σταθερότητα, υδατοδιαλυτότητα, εάν είναι γνωστή),
- κατεργασία της ελεγχόμενης ουσίας/των μαρτύρων πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),
- συνθήκες αποθήκευσης.

Αιτιολόγηση του δερματικού μοντέλου και του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκαν.

Συνθήκες δοκιμής:

- χρησιμοποιηθέν κυτταρικό σύστημα,
- στοιχεία σχετικά με τη βαθμονόμηση της συσκευής μετρήσεων και της διάβασης ζώνης που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας (π.χ. φασματοφωτόμετρο),
- πλήρη στοιχεία τεκμηρίωσης για το συγκεκριμένο μοντέλο δέρματος που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένων των επιδόσεών του. Τα στοιχεία αυτά πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:
 - i) βιωσιμότητα,
 - ii) λειτουργία φραγμού,
 - iii) μορφολογία,
 - iv) αναπαραγωγιμότητα και προγνωστικότητα,
 - v) ποιοτικοί έλεγχοι του μοντέλου,
- λεπτομέρειες για την εφαρμοσθείσα διαδικασία δοκιμών,
- χρησιμοποιηθείσες δόσεις δοκιμής, διάρκεια της έκθεσης και της μετά την αγωγή επώασης,

- περιγραφή των ενδεχόμενων τροποποιήσεων της διαδικασίας της δοκιμής,
- παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το μοντέλο, η οποία πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζεται σ' αυτά:
 - i) αποδοχή των δεδομένων ποιοτικού ελέγχου σε σχέση με ιστορικά δεδομένα για τις παρτίδες,
 - ii) αποδοχή των τιμών του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα σε σχέση με τις μέσες τιμές και το εύρος τιμών που αφορούν τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα.
- Περιγραφή των χρησιμοποιηθέντων κριτηρίων αξιολόγησης, όπου συμπεριλαμβάνεται αιτιολόγηση της επιλογής της ή των τιμών διαχωρισμού για το προγνωστικό μοντέλο.

Αποτελέσματα:

- δεδομένα από τα επιμέρους δοκίμια σε μορφή πίνακα,
- περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. Βιβλιογραφία

1. United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Διαθέσιμο στο Διαδίκτυο, στη διεύθυνση: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html.
2. REACH: Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Διαθέσιμο στο Διαδίκτυο, στη διεύθυνση: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1232447649
3. Μέθοδος δοκιμών Β.4. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ
4. Μέθοδος δοκιμών Β.40. ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ IN VITRO: ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ (TER)
5. Μέθοδος δοκιμών Β.40α. ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ IN VITRO: ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ
6. OECD (2006). Test Guideline 435. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In Vitro* Membrane Barrier Test Method. Εγκρίθηκε στις 19 Ιουλίου 2006. Διαθέσιμο στο Διαδίκτυο, στη διεύθυνση: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html.
7. ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Διαθέσιμο στο Διαδίκτυο, επιλογή Download Study Documents, στη διεύθυνση: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
8. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 15, 57-93.
9. Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicology in Vitro* 16, 765-770.
10. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX* 21, 107-114.
11. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests — An Assessment of the Performance of the Optimised Test. *ATLA* 33, 351-367.
12. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinsteen. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. *ATLA* 33, 329-249.

13. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A. (2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. ATLA 30, 109-129.
14. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.
15. Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α . 135 σελίδες + παραρτήματα. Διαθέσιμο στο Διαδίκτυο, επιλογή Download Study Documents, στη διεύθυνση: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
16. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V. (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603-619.
17. J. Cotovio, M.-H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonnaud, J. Leclair (2007). In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy -Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. Vol.14, 351-358.
18. Δήλωση της επιτροπής ESAC σχετικά με την επικαιροποιημένη δοκιμασία EpiDerm και την παρεμφερή δοκιμασία SkinEthic, 5 Νοεμβρίου 2008.
19. ΕΚ (2006). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης* L 396 της 30.12.2006, Υπηρεσία Επισήμων Εκδόσεων των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, Λουξεμβούργο.
20. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
21. EpiSkin™ SOP, Version 1.6 (January 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test — 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Διαθέσιμο στο Διαδίκτυο, επιλογή Download Study Documents, στη διεύθυνση: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
22. EpiDerm™ SOP, Version 5.0 (October 2004). Draft Standard Operating Procedure. *In Vitro* Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. Διαθέσιμο στο Διαδίκτυο, επιλογή Download Study Documents, στη διεύθυνση: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
23. SkinEthic RHE™ SOP. Θα είναι διαθέσιμο στο Διαδίκτυο, επιλογή Download Study Documents, στη διεύθυνση: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
24. Harvell, J.D., Lamminstusta, K, Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. *Practical Contact Dermatitis* Mc Graw-Hill New York, pp 7-18.
25. Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for *in vitro* skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline. *Ispra*, November 13, 2008.

Προσάρτημα

Αξιολόγηση των χαρακτηριστικών απόδοσης προτεινόμενων μοντέλων ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας για δοκιμή δερματικού ερεθισμού in vitro

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι διαδικασίες που προτείνεται να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών πρέπει να αξιολογούνται για τον προσδιορισμό της αξιοπιστίας και της ορθότητάς τους, με τη βοήθεια ουσιών που αντιπροσωπεύουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα ερεθιστικότητας Draize. Οι τιμές ορθότητας και αξιοπιστίας των προτεινόμενων διαδικασιών, όταν οι τελευταίες αξιολογούνται με τη βοήθεια των 20 συνιστώμενων ουσιών αναφοράς (πίνακας 2), πρέπει να είναι συγκρίσιμες με εκείνες της 1^{ης} επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς (πίνακας 3) (1). Τα πρότυπα ορθότητας και αξιοπιστίας που πρέπει να επιτυγχάνονται παρατίθενται στις ενότητες II και III κατωτέρω. Περιλαμβάνονται μη ταξινομούμενες και ταξινομούμενες (κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών) ουσίες που αντιπροσωπεύουν κατηγορίες χημικών προϊόντων οι οποίες έχουν σημασία, ώστε η αξιοπιστία και οι επιδόσεις (ευαισθησία, ειδικότητα, ψευδοαρνητικά και ψευδοθετικά ποσοστά και ορθότητα) της προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών να μπορούν να συγκριθούν με εκείνες της 1^{ης} επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς. Η αξιοπιστία της μεθόδου δοκιμών και η ικανότητά της να αναγνωρίζει σωστά τις ερεθιστικές ουσίες της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών πρέπει να προσδιορίζονται πριν από τη χρήση της για τον έλεγχο νέων ουσιών.

ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΠΙΔΟΣΕΩΝ

Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν τις ακόλουθες τρεις συνιστώσες: I) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, II) ουσίες αναφοράς και III) καθορισμένες τιμές ορθότητας και αξιοπιστίας (2). Βασίζονται στα πρότυπα επιδόσεων που καθορίστηκαν όταν ολοκληρώθηκε η σχετική με τον δερματικό ερεθισμό μελέτη επικύρωσης του Ευρωπαϊκού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM).

I. Βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών

Γενικοί όροι για το μοντέλο

Πρέπει να χρησιμοποιούνται φυσιολογικά ανθρώπινα κερατινοκύτταρα για την κατασκευή του επιθηλίου. Πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων (βασική, ακανθώδης, κοκκώδης) κάτω από μία λειτουργική κεράτινη στιβάδα. Η κεράτινη στιβάδα πρέπει να είναι πολυστρωματική και να διαθέτει τα αναγκαία λιπιδικά χαρακτηριστικά, ώστε να δημιουργεί στέρεο λειτουργικό φραγμό, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών ουσιών-δεικτών, π.χ. SDS ή Triton X-100. Η λειτουργία φραγμού είναι δυνατόν να εκτιμηθεί με προσδιορισμό είτε της συγκέντρωσης στην οποία μια ουσία-δείκτης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC₅₀) μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης είτε του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % (ET₅₀) μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας-δείκτη. Οι ιδιότητες συγκράτησης του μοντέλου πρέπει να αποτρέπουν την παράκαμψη της κεράτινης στιβάδας από το υλικό και την είσοδό του στον βιώσιμο ιστό, η οποία θα συνεπαγόταν ατελή μοντελοποίηση της έκθεσης του δέρματος. Το μοντέλο δέρματος πρέπει να μην έχει μολυνθεί με βακτηρίδια, ιούς, μυκόπλασμα ή μύκητες.

*Λειτουργικοί όροι για το μοντέλο**Βιωσιμότητα*

Η δοκιμασία που προτιμάται για τον προσδιορισμό της τάξης μεγέθους της βιωσιμότητας είναι η MTT (4). Η OD της χρωστικής που εκχυλίζεται (διαλύεται) από τον ιστό ο οποίος έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα πρέπει να είναι τουλάχιστον εικοσαπλάσια της OD του διαλύτη εκχύλισης. Πρέπει να τεκμηριώνεται ότι ο ιστός που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα είναι σταθερός σε καλλιέργεια (παρέχει παρόμοιες μετρήσεις βιωσιμότητας) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης που προβλέπεται στη δοκιμή.

Λειτουργία φραγμού

Η κεράτινη στιβάδα και η λιπιδική της σύσταση πρέπει να ανδίστανται επαρκώς στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών ουσιών-δεικτών, π.χ. SDS ή Triton X-100, όπως εκτιμάται με τη βοήθεια της τιμής IC₅₀ ή ET₅₀.

Μορφολογία

Κατάλληλα ειδικευμένο προσωπικό πρέπει να εκτελεί ιστολογική εξέταση του ανασυσταθέντος δέρματος/επιδερμίδας, από την οποία πρέπει να προκύπτει δομή όμοια με εκείνη του ανθρώπινου δέρματος/επιδερμίδας (συμπεριλαμβανομένης της ύπαρξης πολυστρωματικής κεράτινης στιβάδας).

Αναπαραγωγιμότητα

Πρέπει να αποδεικνύεται η διαχρονική αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων της εφαρμογής της μεθόδου σε συγκεκριμένο μοντέλο, κατά προτίμηση με τη βοήθεια κατάλληλης ουσίας ελέγχου παρτίδων (συγκριτικής αξιολόγησης) (βλέπε ορισμούς στο τμήμα 1.2).

Ποιοτικοί έλεγχοι του μοντέλου

Κάθε παρτίδα του χρησιμοποιούμενου μοντέλου επιδερμίδας πρέπει να ανταποκρίνεται σε καθορισμένα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι εκείνα που αφορούν τη βιωσιμότητα και τη λειτουργία φραγμού. Ο προμηθευτής του δερματικού μοντέλου (ή, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται μοντέλο εσωτερικής κατασκευής, ο ερευνητής) πρέπει να καθορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για την IC₅₀ ή τον ET₅₀. Οι ιδιότητες φραγμού των ιστών πρέπει να ελέγχονται από το εργαστήριο μετά την παραλαβή τους. Δεκτά για την αξιόπιστη πρόγνωση των ερεθιστικών επιδράσεων μπορούν να γίνουν μόνο αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με ιστούς οι οποίοι πληρούν τα κριτήρια. Κατωτέρω παρατίθενται, ενδεικτικά, τα πεδία τιμών αποδοχής για τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς.

Πίνακας 1

Παραδείγματα κριτηρίων αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής για τους ποιοτικούς ελέγχους

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Μέση τιμή του εύρους τιμών αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
1η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς (αγωγή 18 ωρών με SDS)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 2,32 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
2η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς (1 % Triton X100)	ET ₅₀ = 4,8 ώρες	ET ₅₀ = 6,7 ώρες	ET ₅₀ = 8,7 ώρες

II. Ουσίες αναφοράς

Οι ουσίες αναφοράς χρησιμοποιούνται για να διαπιστωθεί αν η αξιοπιστία και η ορθότητα μιας προτεινόμενης νέας μεθόδου δοκιμών in vitro σε μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας, η οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι δομικά και λειτουργικά επαρκώς ομοειδής με τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς ή αποτελεί ήσσονος σημασίας τροποποίηση επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, είναι συγκρίσιμες με εκείνες της 1^{ης} επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς (1). Μεταξύ των 20 ουσιών αναφοράς που εμφανίζονται στον πίνακα 2 συγκαταλέγονται ουσίες που αντιπροσωπεύουν διάφορες κατηγορίες χημικών προϊόντων ενδιαφέροντος, καθώς και ουσίες της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Ο κατάλογος αυτός περιλαμβάνει 10 ουσίες της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών, 3 ουσίες της προαιρετικής κατηγορίας 3 του GHS και 7 ουσίες που δεν κατατάσσονται σε καμία κατηγορία. Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η προαιρετική κατηγορία 3 θεωρείται ως μη υφιστάμενη. Οι εν λόγω ουσίες αναφοράς συνιστούν τον ελάχιστο αριθμό ουσιών που πρέπει να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ορθότητας και της αξιοπιστίας μιας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών δερματικού ερεθισμού σε μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας. Σε περίπτωση που μια ουσία του καταλόγου δεν είναι διαθέσιμη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες ουσίες για τις οποίες υπάρχουν κατάλληλα δεδομένα αναφοράς από δοκιμές in vivo. Εφόσον κρίνεται σκόπιμο, για την περαιτέρω αξιολόγηση της ορθότητας της προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών επιτρέπεται να προστίθενται στον κατάλογο ελαχίστων ουσιών αναφοράς επιπλέον ουσίες, που αντιπροσωπεύουν άλλες κατηγορίες χημικών προϊόντων και για τις οποίες υπάρχουν κατάλληλα δεδομένα αναφοράς από δοκιμές in vivo.

Πίνακας 2

Ουσίες αναφοράς για τον προσδιορισμό των τιμών ορθότητας και αξιοπιστίας των μοντέλων ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας για δοκιμές δερματικού ερεθισμού

Ουσία (*)	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS	Φυσική κατάσταση	Βαθμολογία σε δοκιμές in vivo	Κατηγορία GHS in vitro	Κατηγορία GHS in vivo
1-βρωμο-4-χλωρο-βουτάνιο	6940-78-9	230-089-3	Υ	0	Κατηγ. 2	Καμία
φθαλικό διαιθύλιο	84-66-2	201-550-6	Υ	0	Καμία	Καμία
ναφθαλινοξικό οξύ	86-87-3	201-705-8	Σ	0	Καμία	Καμία
φαινοξοξικό αλλύλιο	7493-74-5	231-335-2	Υ	0,3	Καμία	Καμία
ισοπροπανόλη	67-63-0	200-661-7	Υ	0,3	Καμία	Καμία
4-μεθυλοθειο-βενζαλδεύδη	3446-89-7	222-365-7	Υ	1	Κατηγ. 2	Καμία
στεατικό μεθύλιο	112-61-8	203-990-4	Σ	1	Καμία	Καμία

Ουσία (*)	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS	Φυσική κατάσταση	Βαθμολογία σε δοκιμές in vivo	Κατηγορία GHS in vitro	Κατηγορία GHS in vivo
βουτυρικό επτύλιο	5870-93-9	227-526-5	Υ	1,7	Καμία	Προαι-ρετική κατηγ. 3
σαλικυλικό εξύλιο	6259-76-3	228-408-6	Υ	2	Καμία	Προαι-ρετική κατηγ. 3
φωσφορικό τρισοβουτύλιο	126-71-6	204-798-3	Υ	2	Κατηγ. 2	Προαιρετική κατηγ. 3
δεκανόλη-1	112-30-1	203-956-9	Υ	2,3	Κατηγ. 2	Κατηγ. 2
κυκλαμιναλδεύδη	103-95-7	203-161-7	Υ	2,3	Κατηγ. 2	Κατηγ. 2
1-βρωμοεξάνιο	111-25-1	203-850-2	Υ	2,7	Κατηγ. 2	Κατηγ. 2
υδροχλωρική 2-γλωρομεθυλο-3,5-διμεθυλο-4-μεθοξύ-πυριδίνη	86604-75-3	434-680-9	Σ	2,7	Κατηγ. 2	Κατηγ. 2
α-τερπινεόλη	98-55-5	202-680-6	Υ	2,7	Κατηγ. 2	Κατηγ. 2
δι-κ-προπυλο-δισουλφίδιο	629-19-6	211-079-8	Υ	3	Καμία	Κατηγ. 2
μεθακρυλικό βουτύλιο	97-88-1	202-615-1	Υ	3	Κατηγ. 2	Κατηγ. 2
5-(1,1-διμεθυλαιθυλο)-2-μεθυλο-βενζολοθειόλη	7340-90-1	438-520-9	Υ	3,3	Κατηγ. 2	Κατηγ. 2
1-μεθυλο-3-φαινυλο-1-πιπεραζίνη	5271-27-2	431-180-2	Σ	3,3	Κατηγ. 2	Κατηγ. 2
επτανάλη	111-71-7	203-898-4	Υ	4	Κατηγ. 2	Κατηγ. 2

(*) Οι 20 ουσίες αναφοράς αποτελούν αντιπροσωπευτική επιλογή μεταξύ των 58 ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την επικύρωση της 1^{ης} μεθόδου αναφοράς (EpiSkin™). Πλήρης κατάλογος ελεγχόμενων ουσιών και τα κριτήρια επιλογής τους είναι διαθέσιμα στη δημοσίευση (5).

Οι ουσίες του πίνακα 2 παρέχουν αντιπροσωπευτική κατανομή των 58 ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη σχετική με τον δερματικό ερεθισμό διεθνή μελέτη επικύρωσης του ECVAM (1), επιλέχθηκαν δε με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

- κυκλοφορούν στο εμπόριο,
- αντιπροσωπεύουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα ερεθιστικότητας Draize (από μη ερεθιστικό έως ισχυρό ερεθιστικό),
- έχουν σαφώς καθορισμένη χημική δομή,
- είναι αντιπροσωπευτικές της αναπαραγωγιμότητας και της προγνωστικής ικανότητας της επικυρωμένης μεθόδου, όπως προσδιορίστηκαν στη μελέτη επικύρωσης του ECVAM,
- είναι αντιπροσωπευτικές της χημικής λειτουργικότητας που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία επικύρωσης,
- δεν τους αποδίδονται άκρως τοξικά χαρακτηριστικά (π.χ. καρκινογόνα ή τοξικά για το αναπαραγωγικό σύστημα) και το κόστος διάθεσης των αποβλήτων τους δεν θεωρείται απαγορευτικό.

III. Καθορισμένες τιμές ορθότητας και αξιοπιστίας

Οι επιδόσεις (ευαισθησία, ειδικότητα, ψευδοαρνητικό και ψευδοθετικό ποσοστό και ορθότητα) της προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών πρέπει να είναι συγκρίσιμες με εκείνες της 1ης επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς (πίνακας 3), δηλαδή η ευαισθησία πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση (\geq) με 80 %, η ειδικότητα μεγαλύτερη ή ίση (\geq) με 70 % και η ορθότητα μεγαλύτερη ή ίση (\geq) με 75 %. Για τον υπολογισμό των επιδόσεων πρέπει να χρησιμοποιούνται όλες οι ταξινομήσεις των 20 ουσιών από τα διάφορα συμμετέχοντα εργαστήρια. Κάθε εργαστήριο πρέπει να ταξινομεί κάθε ουσία χρησιμοποιώντας τη μέση τιμή βιωσιμότητας από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν (τουλάχιστον τρεις έγκυρες μετρήσεις).

Πίνακας 3

Επιδόσεις της 1ης επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς ⁽¹⁾

Μέθοδος δοκιμών	Αριθμός ουσιών	Ευσαιθησία	Ειδικότητα	Ψευδοαρνητικό ποσοστό	Ψευδοθετικό ποσοστό	Ορθότητα
1η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς ⁽¹⁾	58	87,2 % ⁽²⁾	71,1 % ⁽³⁾	12,8 %	29,9 %	74,7 %
1η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς ⁽¹⁾	20	90 %	73,3 %	10 %	26,7 %	81,7 %

⁽¹⁾ EpiSkin™

⁽²⁾ Με βάση 13 ερεθιστικές ουσίες της κατηγορίας 2 του GHS

⁽³⁾ Με βάση 45 ουσίες, ερεθιστικές της κατηγορίας 3 του GHS ή μη κατατασσόμενες σε καμία κατηγορία του GHS

Η αξιοπιστία της προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών πρέπει να είναι συγκρίσιμη με εκείνη των επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς.

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα

Από την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής μεταβλητότητας πρέπει να προκύπτει συμφωνία μεγαλύτερη ή ίση (\geq) με 90 % μεταξύ των ταξινομήσεων (κατηγορία 2/καμία κατηγορία) τις οποίες είχαν ως αποτέλεσμα οι διαφορετικές ανεξάρτητες μετρήσεις με τις 20 ουσίες αναφοράς στο ίδιο εργαστήριο.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα

Η εκτίμηση της διεργαστηριακής αναπαραγωγικότητας δεν είναι απαραίτητη, εάν η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μόνο σε ένα εργαστήριο. Σε περίπτωση μεταφοράς μεθόδου μεταξύ εργαστηρίων, η συμφωνία μεταξύ των ταξινομήσεων (κατηγορία 2/καμία κατηγορία) τις οποίες είχαν ως αποτέλεσμα οι διαφορετικές ανεξάρτητες μετρήσεις με τις 20 ουσίες αναφοράς τουλάχιστον σε τρία, κατά προτίμηση, εργαστήρια πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση (\geq) με 80 %.

Βιβλιογραφία

1. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.
2. OECD (2005) Guidance Document No. 34 on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD, Paris.
3. ECVAM (2007) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Διαθέσιμο στο Διαδίκτυο, στη διεύθυνση <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>, επιλογή Download Study Documents. Πρόσβαση στις 27.10.2008.
4. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63.
5. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V. (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603-619.

⁽¹⁾ Ο πίνακας 3 παρέχει τις επιδόσεις της 1ης επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, οι οποίες αφορούν την ικανότητά της να αναγνωρίζει σωστά τις ερεθιστικές ουσίες (κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών) και τις μη ταξινομούμενες (καμία κατηγορία, όπου συμπεριλαμβάνεται και η προαιρετική κατηγορία 3), για τις 58 και τις 20 ουσίες αναφοράς (πίνακας 2).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Γ.3. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΦΥΚΗ (ΑΛΓΕΣ) ΚΑΙ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 201 (2006) του ΟΟΣΑ (1).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται και επικαιροποιούνται κατά περιόδους με τα δεδομένα της επιστημονικής προόδου. Η μέθοδος δοκιμών Γ.3 έπρεπε να αναθεωρηθεί, ώστε να συμπεριληφθούν πρόσθετα είδη οργανισμών και να καλυφθούν οι απαιτήσεις που αφορούν την εκτίμηση των κινδύνων και την ταξινόμηση των χημικών ουσιών. Η αναθεώρηση αυτή ολοκληρώθηκε με βάση την εκτενή πρακτική πείρα, την επιστημονική πρόοδο στο πεδίο των μελετών της τοξικότητας των φυκών και την ευρεία κανονιστική χρήση στο διάστημα που μεσολάβησε από την πρώτη έγκριση της μεθόδου.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί και συντημήσεις:

Βιομάζα: το ξηρό βάρος της ζώσας ύλης την οποία περιέχει ένας πληθυσμός, εκφραζόμενο ως προς δεδομένο όγκο, π.χ. mg φυκών/λίτρο διαλύματος δοκιμής. Η βιομάζα ορίζεται συνήθως ως μάζα, αλλά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών η λέξη αυτή χρησιμοποιείται για να δηλώσει τον λόγο μάζας προς όγκο. Επίσης, στην παρούσα δοκιμή μετρώνται συνήθως υποκατάστατα βιομάζας, όπως αριθμός κυττάρων, φθορισμός κ.λπ.. Ως εκ τούτου, ο όρος βιομάζα αναφέρεται και σε αυτά τα υποκατάστατα μέτρα.

Συντελεστής μεταβολής: αδιάστατο μέτρο της μεταβλητότητας μιας παραμέτρου, το οποίο ορίζεται ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης προς τον μέσο όρο και μπορεί επίσης να εκφραστεί σε ποσοστό επί τοις εκατό. Η μέση τιμή του συντελεστή μεταβολής του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης σε πολλαπλές καλλιέργειες μάρτυρες πρέπει να υπολογίζεται ως εξής:

1. Υπολογίζεται ο επί τοις εκατό συντελεστής μεταβολής του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης από τους ημερήσιους/τμηματικούς ρυθμούς ανάπτυξης για καθεμία από τις πολλαπλές καλλιέργειες.
2. Εξάγεται ο μέσος όρος όλων των τιμών που υπολογίστηκαν στο σημείο 1, ώστε να προκύψει η μέση τιμή του συντελεστή μεταβολής του ημερήσιου/τμηματικού ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στις πολλαπλές καλλιέργειες μάρτυρες.

EC_x: η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, διαλελυμένης στο υλικό δοκιμής, η οποία προκαλεί μείωση της ανάπτυξης του οργανισμού δοκιμής κατά x % (π.χ. 50 %) εντός της δηλούμενης περιόδου έκθεσης (πρέπει να αναφέρεται επακριβώς, εάν διαφέρει από την πλήρη ή κανονική διάρκεια της δοκιμής). Για να δηλώνεται σαφώς αν η τιμή EC έχει προκύψει από τον ρυθμό ανάπτυξης ή από την απόδοση, χρησιμοποιούνται τα σύμβολα «E_xC» και «E_xC», αντίστοιχα.

Θρεπτικό υλικό: το πλήρες συνθετικό μέσο καλλιέργειας, στο οποίο αναπτύσσονται τα φύκη δοκιμής, όταν εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία. Η ελεγχόμενη ουσία είναι κατά κανόνα διαλελυμένη στο υλικό δοκιμής.

Ρυθμός ανάπτυξης (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης): η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας κατά την περίοδο έκθεσης.

Κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC, από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων Lowest Observed Effect Concentration): η χαμηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση, στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης (με $p < 0,05$) υπό την επίδραση της ουσίας, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, εντός δεδομένου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι ελεγχόμενες συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τη LOEC πρέπει να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση όπου δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, πρέπει να εξηγηθεί πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων No Observed Effect Concentration): η αμέσως μικρότερη από τη LOEC ελεγχόμενη συγκέντρωση.

Μεταβλητή απόκριση: μεταβλητή για την εκτίμηση της τοξικότητας, η οποία προκύπτει, με διάφορες μεθόδους υπολογισμού, από κάθε μετρούμενη παράμετρο που περιγράφει τη βιομάζα. Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου, οι ρυθμοί ανάπτυξης και η απόδοση είναι μεταβλητές απόκρισης που προκύπτουν από τη μέτρηση της βιομάζας κατευθείαν ή κάθε αναφερόμενου υποκατάστατου.

Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: μεταβλητή απόκρισης, η οποία ορίζεται ως το πηλίκο της διαφοράς των φυσικών λογαρίθμων μιας παρατηρούμενης παραμέτρου (στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, της βιομάζας) προς το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

Απόδοση: ισούται με την τιμή μετρούμενης μεταβλητής στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον την τιμή της ίδιας μεταβλητής στην αρχή της περιόδου έκθεσης, διαφορά που εκφράζει την αύξηση της βιομάζας στη διάρκεια της δοκιμής.

1.3. ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται με τη μεγαλύτερη ευχέρεια σε υδατοδιαλυτές ουσίες, οι οποίες είναι πιθανόν να παραμείνουν στο νερό στις συνθήκες της δοκιμής. Για τον έλεγχο πτητικών, ισχυρώς απορροφώμενων, εγχρωμων ή δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών ή ουσιών που μπορεί να επηρεάσουν τη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων ή ανόργανων αλάτων στο υλικό δοκιμής, ενδέχεται να απαιτηθούν ορισμένες τροποποιήσεις της περιγραφόμενης διαδικασίας (π.χ. κλειστό σύστημα, εγκλιματισμός των δοκιμαστικών δοχείων). Καθοδήγηση σχετικά με ορισμένες κατάλληλες τροποποιήσεις παρέχεται στις δημοσιεύσεις (2), (3) και (4).

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η παρούσα δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό των επιδράσεων μιας ουσίας στην ανάπτυξη μικροφυκών (μικροαλγών) ή/και κυανοβακτηριδίων των γλυκών υδάτων. Οργανισμοί δοκιμής που βρίσκονται στη λογαριθμική (εκθετική) φάση ανάπτυξης εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου (ασυνεχείς) για χρονικό διάστημα 72 ωρών κατά κανόνα. Παρά τη σχετικά μικρή διάρκεια της δοκιμής, είναι δυνατόν να εκτιμηθούν οι επιδράσεις σε πολλές γενεές.

Η απόκριση του συστήματος συνίσταται στη μείωση της ανάπτυξης σε μια σειρά καλλιιεργειών φυκών (μονάδες δοκιμής) που εκτίθενται σε διάφορες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Η απόκριση αξιολογείται συναρτήσει της συγκέντρωσης έκθεσης σε σύγκριση με τη μέση ανάπτυξη σε πολλαπλές καλλιέργειες μάρτυρες, οι οποίες δεν έχουν εκτεθεί στην ουσία. Για την πλήρη έκφραση της απόκρισης του συστήματος στις τοξικές επιδράσεις (βέλτιστη ευαισθησία), οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν λογαριθμικά χωρίς περιορισμούς, σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών στοιχείων και συνεχούς φωτισμού, για επαρκές χρονικό διάστημα, ώστε να μετρηθεί η μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης.

Η ανάπτυξη και η αναστολή της προσδιορίζονται ποσοτικά με μετρήσεις της βιομάζας φυκών συναρτήσει του χρόνου. Η βιομάζα φυκών ορίζεται ως το ξηρό βάρος ανά μονάδα όγκου, π.χ. mg φυκών/λίτρο διαλύματος δοκιμής. Ωστόσο, το ξηρό βάρος είναι δύσκολο να μετρηθεί και, για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται υποκατάστατες παράμετροι, μεταξύ των οποίων συνήθιστα χρησιμοποιείται ο αριθμός κυττάρων. Άλλα υποκατάστατα είναι ο κυτταρικός όγκος, ο φθορισμός, η οπτική πυκνότητα κ.λπ.. Θα πρέπει να είναι γνωστός ο συντελεστής μετατροπής της μετρούμενης υποκατάστατης παραμέτρου σε βιομάζα.

Το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, εκφραζόμενη σε λογαριθμική αύξηση της βιομάζας (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης) στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Από τους μέσους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης που καταγράφονται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης κατά $x\%$ (π.χ. 50%) και εκφράζεται ως $E_x C_x$ (π.χ. $E_5 C_{50}$).

Για την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου εντός του κανονιστικού πλαισίου της ΕΕ, ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων πρέπει να βασίζεται σε μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης για τους λόγους που εκτίθενται στο σημείο 2.2 κατωτέρω. Μία επιπλέον μεταβλητή απόκριση που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι η επίδοση, η οποία ενδέχεται να απαιτείται για τη συμμόρφωση με ειδικές κανονιστικές απαιτήσεις σε ορισμένες χώρες. Η απόδοση ορίζεται ως η βιομάζα στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον τη βιομάζα στην αρχή της περιόδου αυτής. Από την απόδοση που καταγράφεται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της απόδοσης κατά $x\%$ (π.χ. 50%) και εκφράζεται ως $E_y C_x$ (π.χ. $E_{50} C_{50}$).

Επιπροσθέτως, μπορούν να προσδιοριστούν στατιστικά η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC).

1.5. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Στις σχετικές με την ελεγχόμενη ουσία πληροφορίες, που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής, περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, ο βαθμός καθαρότητας, η σταθερότητα στο φως, η σταθερότητα στις συνθήκες της δοκιμής, η απορρόφηση του φωτός, η σταθερά pKa και τα αποτελέσματα δοκιμών μετατροπής, συμπεριλαμβανομένης της βιοαποικοδομησιμότητας στο νερό.

Θα πρέπει να είναι γνωστά η διαλυτότητα στο νερό, ο συντελεστής κατανομής σε μίγμα οκτανόλης/νερού (P_{ow}) και η τάση ατμών της ελεγχόμενης ουσίας και να υπάρχει επικυρωμένη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα διαλύματα δοκιμής, της οποίας έχουν αναφερθεί η απόδοση ανάκτησης και το όριο ανίχνευσης.

1.6. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Είναι δυνατόν να υποβληθούν σε δοκιμή μία ή περισσότερες ουσίες αναφοράς, όπως η 3,5-διχλωρο-φαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στη διεθνή κυκλική δοκιμή (ring test) (4), προκειμένου να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής. Το διχρωμικό κάλιο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως ουσία αναφοράς για τα πράσινα φύκη. Είναι σκόπιμο να υποβάλλεται η ουσία αναφοράς σε δοκιμή τουλάχιστον ανά εξάμηνο.

1.7. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:

- Η βιομάζα στις καλλιέργειες μάρτυρες πρέπει να έχει αυξηθεί λογαριθμικά με συντελεστή τουλάχιστον 16 εντός των 72 ωρών που διαρκεί η δοκιμή. Αυτό αντιστοιχεί σε ειδικό ρυθμό ανάπτυξης $0,92 \text{ ημέρα}^{-1}$. Ο ρυθμός ανάπτυξης των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων ειδών είναι συνήθως σημαντικά υψηλότερος (βλέπε προσάρτημα 1). Το κριτήριο αυτό μπορεί να μην πληρούται όταν χρησιμοποιούνται είδη βραδύτερης ανάπτυξης από εκείνα που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1. Στην περίπτωση αυτή, η διάρκεια της δοκιμής πρέπει να παρατείνεται, μέχρι να επιτευχθεί τουλάχιστον δεκαεξαπλάσια αύξηση στις καλλιέργειες μάρτυρες, ενώ η ανάπτυξη πρέπει να βρίσκεται σε λογαριθμική φάση σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Η διάρκεια της δοκιμής είναι δυνατόν να συντομευτεί σε 48 ώρες, τουλάχιστον, ώστε να διατηρηθεί η απεριόριστη λογαριθμική ανάπτυξη κατά τη δοκιμή, εφόσον επιτυγχάνεται ο ελάχιστος πολλαπλασιαστής 16.
- Η μέση τιμή του συντελεστή μεταβολής για τους τμηματικούς ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης (ημέρες 0-1, 1-2 και 2-3, στην περίπτωση της δοκιμής 72 ωρών) των καλλιεργειών μαρτύρων (βλέπε σημείο 1.2 υπό «Συντελεστής μεταβολής») δεν πρέπει να υπερβαίνει το 35 %. Ο υπολογισμός του τμηματικού ειδικού ρυθμού ανάπτυξης περιγράφεται στο σημείο 2.2.1, δεύτερο εδάφιο. Το κριτήριο αυτό εφαρμόζεται στη μέση τιμή των συντελεστών μεταβολής που υπολογίζεται για τις πολλαπλές καλλιέργειες μάρτυρες.
- Στις δοκιμές σε *Pseudokirchneriella subcapitata* και *Desmodesmus subspicatus*, ο συντελεστής μεταβολής των μέσω ειδικών ρυθμών ανάπτυξης των πολλαπλών καλλιεργειών μαρτύρων, στο σύνολο της περιόδου δοκιμής, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 7 %. Για άλλα, σπανιότερα χρησιμοποιούμενα είδη, η αντίστοιχη τιμή δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 %.

1.8. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.8.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

Τα δοκιμαστικά δοχεία και τα υπόλοιπα σκεύη που πρόκειται να ελθουν σε επαφή με τα διαλύματα δοκιμής πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα είδη του εξοπλισμού πρέπει να εκπλύνονται σχολαστικά, ώστε να εξασφαλίζεται η απουσία παρεμβολής οργανικών ή ανόργανων ξένων προσμίξεων στην ανάπτυξη των φυκών ή στη σύσταση του διαλυμάτων δοκιμής.

Τα δοκιμαστικά δοχεία είναι, κατά κανόνα, γυάλινες φιάλες, των οποίων οι διαστάσεις εξασφαλίζουν επαρκή όγκο καλλιέργειας για την εκτέλεση μετρήσεων στη διάρκεια της δοκιμής και επαρκή μεταφορά μάζας CO_2 από την ατμόσφαιρα (βλέπε σημείο 1.8.9, δεύτερο εδάφιο). Σημειώτεον ότι ο όγκος του υγρού πρέπει να επαρκεί για τους αναλυτικούς προσδιορισμούς (βλέπε σημείο 1.8.11, πέμπτο εδάφιο).

Επιπλέον, απαιτούνται ορισμένα από τα ακόλουθα όργανα ή και όλα:

- Συσσκευή καλλιέργειας: συνιστάται η χρήση ερμαρίου ή θαλάμου, στο οποίο η επιλεγμένη θερμοκρασία επώασης μπορεί να διατηρείται με ακρίβεια $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Φωτόμετρα: πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος μέτρησης της φωτεινής έντασης, ειδικότερα δε ο τύπος δέκτη (συλλέκτη) επηρεάζει τη μετρούμενη τιμή. Οι μετρήσεις πρέπει να εκτελούνται κατά προτίμηση με σφαιρικό (4 π) δέκτη (που αποκρίνεται στο άμεσο και στο ανακλώμενο φως από όλες τις γωνίες πάνω και κάτω από το επίπεδο μέτρησης) ή με δέκτη 2 π (που αποκρίνεται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες πάνω από το επίπεδο μέτρησης).
- Συσσκευή προσδιορισμού της βιομάζας φυκών: Ο αριθμός κυττάρων, η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη παράμετρος ως υποκατάστατο της βιομάζας φυκών, μπορεί να καταμετρηθεί με ηλεκτρονικό απαριθμητή σωματιδίων, μικροσκόπιο με θάλαμο καταμέτρησης ή κυτταρόμετρο ροής. Άλλα υποκατάστατα της βιομάζας μπορούν να μετρηθούν με κυτταρόμετρο ροής, φθορισμόμετρο, φασματοφωτόμετρο ή χρωματομέτρο. Είναι χρήσιμο να υπολογίζεται συντελεστής μετατροπής που συνδέει τον αριθμό κυττάρων με το ξηρό βάρος. Όταν χρησιμοποιείται φασματοφωτόμετρο, ενδέχεται να απαιτούνται κυψελίδες οπτικής διαδρομής τουλάχιστον 4 cm, προκειμένου να ληφθούν χρήσιμες μετρήσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις βιομάζας.

1.8.2. Οργανισμοί δοκιμής

Μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορα είδη μη ενωμένων μικροφυκών και κυανοβακτηριδίων. Τα στελέχη που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1 έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για χρήση στη διαδικασία δοκιμής που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Σε περίπτωση χρήσης άλλων ειδών, θα πρέπει να αναφέρεται το στέλεχος ή/και η προέλευση. Πρέπει να επιβεβαιώνεται η δυνατότητα διατήρησης της λογαριθμικής ανάπτυξης των επιλεγμένων φυκών δοκιμής σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, στις επικρατούσες συνθήκες.

1.8.3. Θρεπτικό υλικό

Συνιστάται η χρήση δύο θρεπτικών υλικών εναλλακτικά: του υλικού του ΟΟΣΑ και του υλικού ΑΑΡ. Η σύσταση των υλικών αυτών παρατίθεται στο προσάρτημα 2. Σημειωτέον ότι η αρχική τιμή του pH και η ρυθμιστική χωρητικότητα (ικανότητα ρύθμισης της αύξησης του pH) των δύο θρεπτικών υλικών είναι διαφορετικές. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των δοκιμών ενδέχεται να διαφέρουν ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο υλικό, ιδίως κατά τον έλεγχο ιονίζομενων ουσιών.

Για ορισμένους σκοπούς, π.χ. για τον έλεγχο μετάλλων και παραγόντων χηλικής συμπλοκοποίησης ή για τη διεξαγωγή δοκιμών σε διαφορετικές τιμές pH, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να τροποποιηθούν τα θρεπτικά υλικά. Η χρήση τροποποιημένου υλικού πρέπει να περιγράφεται λεπτομερώς και να αιτιολογείται (3)(4).

1.8.4. Αρχική συγκέντρωση βιομάζας

Η αρχική βιομάζα στις καλλιέργειες δοκιμής πρέπει να είναι η ίδια σε όλες και αρκετά μικρή, ώστε να επιτρέπει τη λογαριθμική ανάπτυξη σε όλη τη διάρκεια της περιόδου επώασης, χωρίς τον κίνδυνο να εξαντληθούν τα θρεπτικά στοιχεία. Η αρχική βιομάζα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,5 mg/l σε ξηρό βάρος. Συνιστώνται οι ακόλουθες αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων:

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> :	5×10^3 - 10^4	κύτταρα/ml
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	2 - 5×10^3	κύτταρα / ml
<i>Navicula pelliculosa</i>	10^4	κύτταρα / ml
<i>Anabaena flos-aquae</i>	10^4	κύτταρα / ml
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	5×10^4 - 10^5	κύτταρα / ml

1.8.5. Συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας

Το εύρος συγκεντρώσεων στο οποίο είναι πιθανόν να σημειωθούν επιδράσεις μπορεί να προσδιοριστεί με βάση τα αποτελέσματα δοκιμών εύρεσης εύρους τιμών. Για την τελική και οριστική δοκιμή, θα πρέπει να επιλέγονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο, με λόγο πρόόδου που να μην υπερβαίνει το 3,2. Στην περίπτωση των ελεγχόμενων ουσιών με επίπεδη καμπύλη απόκρισης ως προς τη συγκέντρωση, ενδέχεται να δικαιολογείται υψηλότερος λόγος πρόόδου. Η σειρά των συγκεντρώσεων θα πρέπει κατά προτίμηση να καλύπτει το εύρος που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης των φυκών κατά 5-75 %.

1.8.6. Πολλαπλοί προσδιορισμοί (replicates) και μάρτυρες

Ο σχεδιασμός της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τριπλό προσδιορισμό σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής. Εάν δεν απαιτείται προσδιορισμός της ΝΟΕC, είναι δυνατόν να τροποποιηθεί ο σχεδιασμός της δοκιμής, ώστε να αυξηθεί το πλήθος των συγκεντρώσεων και να μειωθεί το πλήθος των προσδιορισμών ανά συγκέντρωση. Οι μάρτυρες πρέπει να είναι τουλάχιστον τρεις και, στην ιδανική περίπτωση, τουλάχιστον διπλάσιοι από το πλήθος των προσδιορισμών σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής.

Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί χωριστή σειρά διαλυμάτων δοκιμής για τον αναλυτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας (βλέπε σημείο 1.8.11, τέταρτο και έκτο εδάφιο).

Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης για τη διάλυση της ελεγχόμενης ουσίας, ο σχεδιασμός της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει πρόσθετους μάρτυρες, που περιέχουν τον διαλύτη στην ίδια συγκέντρωση με τη χρησιμοποιούμενη στις καλλιέργειες δοκιμής.

1.8.7. Παρασκευή της καλλιέργειας εμβολιασμού (ενοφθαλμισμού)

Για να προσαρμοστούν τα φύκη δοκιμής στις συνθήκες της δοκιμής και να εξασφαλιστεί ότι βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης κατά τον εμβολιασμό των διαλυμάτων δοκιμής, παρασκευάζεται καλλιέργεια εμβολιασμού 2-4 ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής. Η βιομάζα φυκών θα πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε η καλλιέργεια εμβολιασμού να είναι λογαριθμική μέχρι την έναρξη της δοκιμής. Η καλλιέργεια αυτή επωάζεται στις ίδιες συνθήκες όπως οι καλλιέργειες δοκιμής. Μετράται η αύξηση της βιομάζας στην καλλιέργεια εμβολιασμού για να εξασφαλιστεί ότι η ανάπτυξη βρίσκεται στο φυσιολογικό πεδίο τιμών για το στέλεχος δοκιμής στις συνθήκες καλλιέργειας. Παράδειγμα διαδικασίας καλλιέργειας φυκών παρέχεται στο προσάρτημα 3. Για να αποτραπεί η σύγχρονη (συγχρονισμένη) κυτταρική διαίρεση στη διάρκεια της δοκιμής, ενδέχεται να απαιτηθεί ένα δεύτερο στάδιο πολλαπλασιασμού στην καλλιέργεια εμβολιασμού.

1.8.8. Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής

Όλα τα διαλύματα δοκιμής πρέπει να περιέχουν τις ίδιες συγκεντρώσεις θρεπτικού υλικού και την ίδια αρχική βιομάζα φυκών δοκιμής. Τα διαλύματα δοκιμής με τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με ανάμιξη μητρικού διαλύματος της ελεγχόμενης ουσίας, θρεπτικού υλικού και καλλιέργειας εμβολιασμού. Τα μητρικά διαλύματα παρασκευάζονται κατά κανόνα με διάλυση της ουσίας στο υλικό δοκιμής.

Μπορούν να χρησιμοποιούνται διαλύτες, π.χ. ακετόνη, τριπ. βουτυλική αλκοόλη και διμεθυλοφορμαμίδιο, ως φορείς για την προσθήκη δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών στο υλικό δοκιμής (2)(3). Η συγκέντρωση του διαλύτη δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 μl/l, ενώ πρέπει να προστίθεται διαλύτης στην ίδια συγκέντρωση σε όλες τις καλλιέργειες της σειράς της δοκιμής (συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων).

1.8.9. Επώαση

Τα δοκιμαστικά δοχεία πωματίζονται με διαπερατά από τον αέρα πώματα. Τα δοχεία ανακινούνται και τοποθετούνται στη συσκευή καλλιέργειας. Κατά τη δοκιμή, είναι απαραίτητο να διατηρούνται τα φύκια σε εναιώρημα και να διευκολύνεται η μεταφορά CO₂. Για τον σκοπό αυτό, απαιτείται συνεχής ανατάραξη ή ανάδευση. Οι καλλιέργειες πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία μεταξύ 21 και 24 °C, ρυθμιζόμενη με ακρίβεια ± 2 °C. Για άλλα είδη εκτός εκείνων που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1, π.χ. τροπικά είδη, ενδέχεται να ενδείκνυνται υψηλότερες θερμοκρασίες, υπό τον όρο ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας. Συνιστάται τυχαιοποιημένη τοποθέτηση των φιαλών στον επωαστήρα και αλλαγή των θέσέων τους κάθε ημέρα.

Το pH του υλικού μάρτυρα δεν θα πρέπει να αυξάνεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδα στη διάρκεια της δοκιμής. Στην περίπτωση των μετάλλων και των ουσιών που ιονίζονται εν μέρει σε τιμές pH γύρω από το pH της δοκιμής, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να περιοριστεί η μεταβολή του pH, προκειμένου να ληφθούν αναπαραγωγικά και σαφή αποτελέσματα. Μεταβολή του pH < 0,5 μονάδα είναι τεχνικά εφικτή και μπορεί να επιτευχθεί με την εξασφάλιση κατάλληλης ταχύτητας μεταφοράς μάζας CO₂ από τον αέρα του περιβάλλοντος στο διάλυμα δοκιμής, π.χ. με αύξηση της ταχύτητας ανατάραξης. Άλλη δυνατότητα είναι η μείωση του απαιτούμενου CO₂ με μείωση της αρχικής βιομάζας ή της διάρκειας της δοκιμής.

Η επιφάνεια στην οποία επωάζονται οι καλλιέργειες θα πρέπει να φωτίζεται με συνεχές, ομοιόμορφο φως φθορισμού, π.χ. τύπου «ψυχρό λευκό φως» ή «φως ημέρας». Τα στελέχη φυκών και κυανοβακτηριδίων έχουν διαφορετικές απαιτήσεις φωτός. Θα πρέπει να επιλέγεται η φωτεινή ένταση που είναι κατάλληλη για τον χρησιμοποιούμενο οργανισμό δοκιμής. Για τα συνιστώμενα είδη πράσινων φυκών, η φωτεινή ένταση στο επίπεδο των διαλυμάτων δοκιμής επιλέγεται από το εύρος τιμών 60-120 μE·m⁻²·s⁻¹, μετρούμενη στο αποτελεσματικό από πλευράς φωτοσύνθεσης μήκος κύματος 400-700 nm με κατάλληλο δέκτη. Ορισμένα είδη, ιδίως το *Anabaena flos-aquae*, αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε χαμηλότερες τιμές φωτεινής έντασης και μπορεί να υποστούν βλάβες σε υψηλές τιμές. Για τα είδη αυτά, θα πρέπει να επιλέγεται μέση φωτεινή ένταση 40-60 μE·m⁻²·s⁻¹. (στην περίπτωση των φωτομέτρων που είναι βαθμολογημένα σε lux, το πεδίο τιμών 4 440-8 880 lux, προκειμένου για ψυχρό λευκό φως, αντιστοιχεί περίπου στη συνιστώμενη φωτεινή ένταση των 60-120 μE·m⁻²·s⁻¹). Η φωτεινή ένταση δεν πρέπει να μεταβάλλεται κατά περισσότερο από ± 15 % έναντι της μέσης φωτεινής έντασης στην περιοχή επώασης.

1.8.10. Διάρκεια της δοκιμής

Η δοκιμή διαρκεί κατά κανόνα 72 ώρες. Ωστόσο, είναι δυνατόν να επιλεγούν μικρότερα ή μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, υπό τον όρο ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που αναφέρονται στο σημείο 1.7.

1.8.11. Μετρήσεις και αναλυτικοί προσδιορισμοί

Προσδιορίζεται η βιομάζα φυκών σε κάθε φιάλη, τουλάχιστον κάθε ημέρα στη διάρκεια της δοκιμής. Εάν οι μετρήσεις εκτελούνται σε μικρές ποσότητες που αφαιρούνται με σιφόνιο (πιπέτα) από το διάλυμα δοκιμής, οι τελευταίες δεν θα πρέπει να αναπληρώνονται.

Η βιομάζα μετράται με χειρωνακτική καταμέτρηση κυττάρων σε μικροσκόπιο ή με ηλεκτρονικό απαριθμητή σωματιδίων (σε αριθμό κυττάρων ή/και βιο-όγκο). Μπορούν να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές τεχνικές, π.χ. κυτταρομετρία ροής, φθορισμός χλωροφύλλης in vitro ή in vivo (6)(7), οπτική πυκνότητα, εφόσον είναι δυνατόν να αποδειχθεί ικανοποιητική συσχέτιση με τη βιομάζα στο πεδίο τιμών βιομάζας που συναντάται στη δοκιμή.

Μετράται το pH των διαλυμάτων στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

Εφόσον υπάρχει αναλυτική διαδικασία που επιτρέπει τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας στο χρησιμοποιούμενο εύρος συγκεντρώσεων, τα διαλύματα δοκιμής θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση για την εξακρίβωση των αρχικών συγκεντρώσεων και τη διατήρηση των συγκεντρώσεων έκθεσης στη διάρκεια της δοκιμής.

Στις περιπτώσεις όπου οι συγκεντρώσεις έκθεσης αναμένεται να διαφέρουν από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις κατά λιγότερο από 20 % στη διάρκεια της δοκιμής, ενδέχεται να αρκεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής, στο χαμηλό και στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης δοκιμής, καθώς και σε ένα επίπεδο κοντά στην αναμενόμενη EC_{50} . Συνιστάται να προσδιορίζονται όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής στην αρχή και στο τέλος της, εφόσον οι τελευταίες είναι απίθανο να παραμείνουν εντός των ορίων του 80-120 % των ονομαστικών τιμών. Προκειμένου για πτητικές, ασταθείς ή ισχυρώς απορροφώμενες ελεγχόμενες ουσίες, συνιστάται πρόσθετη δειγματοληψία για ανάλυση ανά 24 ώρες στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, ώστε να προσδιορίζεται ακριβέστερα η απώλεια ελεγχόμενης ουσίας. Στην περίπτωση των ουσιών αυτών, χρειάζεται μεγαλύτερο πλήθος προσδιορισμών. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας είναι αναγκαίο να προσδιορίζονται μόνο σε ένα από τα πολλαπλά δοχεία για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ή στο συνενωμένο περιεχόμενο των δοχείων ανά πολλαπλό προσδιορισμό).

Τα υλικά δοκιμής που παρασκευάζονται ειδικά για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων έκθεσης κατά τη δοκιμή θα πρέπει να υποβάλλονται στην ίδια ακριβώς αγωγή όπως εκείνα που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή, δηλαδή να εμβολιάζονται με φύκη και να επωάζονται σε πανομοιότυπες συνθήκες. Εάν απαιτείται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της διαλελυμένης ελεγχόμενης ουσίας, ενδέχεται να είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των φυκών από το υλικό. Ο διαχωρισμός θα πρέπει κατά προτίμηση να εκτελείται με φυγοκέντρηση σε χαμηλή ισχύ g, επαρκή για την καθίζηση των φυκών.

Εάν υπάρχουν στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά εντός των ορίων της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης $\pm 20\%$ σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να βασιστεί στις ονομαστικές ή μετρηθείσες αρχικές τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση υπερβαίνει το $\pm 20\%$, η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να βασίζεται στον γεωμετρικό μέσο όρο των συγκεντρώσεων κατά την έκθεση ή σε μοντέλα που περιγράφουν τη μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας (3)(8).

Η δοκιμή αναστολής της ανάπτυξης φυκών είναι δυναμικότερο σύστημα δοκιμών από την πλειονότητα των υπολοίπων δοκιμών βραχυπρόθεσμης τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς. Κατά συνέπεια, ενδέχεται να είναι δύσκολο να προσδιοριστούν οι πραγματικές συγκεντρώσεις έκθεσης, ιδίως όταν ελέγχονται προσροφώμενες ουσίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στις περιπτώσεις αυτές, η εξαφάνιση της ουσίας από το σύστημα δοκιμής. Κατά την ανάλυση του αποτελέσματος της δοκιμής, θα πρέπει να εξακριβώνεται κατά πόσον η μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στην πορεία της δοκιμής συνοδεύεται από ελαττωμένη αναστολή της ανάπτυξης. Εάν ναι, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο εφαρμογής κατάλληλου μοντέλου που περιγράφει τη μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας (8). Εάν όχι, μπορεί να ενδεικνύεται να βασιστεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων στις αρχικές (ονομαστικές ή μετρηθείσες) συγκεντρώσεις.

1.8.12. Άλλες παρατηρήσεις

Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να εκτελείται μικροσκοπική παρατήρηση για την εξακρίβωση της φυσιολογικής και υγιούς εμφάνισης της καλλιέργειας εμβολιασμού και για τον εντοπισμό τυχόν ανωμαλιών στην εμφάνιση των φυκών (τις οποίες έχει ενδεχομένως προκαλέσει η έκθεση στην ελεγχόμενη ουσία).

1.8.13. Οριακή δοκιμή

Σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν από προκαταρκτική δοκιμή έχει προκύψει ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε συγκεντρώσεις έως $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ή έως το όριο διαλυτότητας της στο υλικό δοκιμής (αναλόγως του ποια είναι μικρότερη), είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή, η οποία συνίσταται σε σύγκριση των αποκρίσεων μίας ομάδας μάρτυρα και μίας ομάδας αγωγής (συγκέντρωση ίση με $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ή με το όριο διαλυτότητας). Συνιστάται ένθερμα να τεκμηριώνεται αυτό με ανάλυση της συγκέντρωσης έκθεσης. Η οριακή δοκιμή υπόκειται σε όλες τις συνθήκες δοκιμής και όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται ανωτέρω, εξαιρουμένου του αριθμού των δοχείων, που θα πρέπει να είναι τουλάχιστον έξι. Οι μεταβλητές απόκρισης της ομάδας αγωγής και της ομάδας μάρτυρα είναι δυνατόν να υποβληθούν σε στατιστική ανάλυση με δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων, π.χ. δοκιμή t του Student. Εάν οι διακυμάνσεις στις δύο ομάδες είναι άνισες, θα πρέπει να διεξάγεται προσαρμοσμένη δοκιμή t για άνισες διακυμάνσεις.

1.8.14. Τροποποίηση για ουσίες έντονου χρώματος

Η ακτινοβόληση (φωτεινή ένταση) πρέπει να έχει τιμή ευρισκόμενη στο άνω άκρο του εύρους τιμών που καθορίζεται στην παρούσα μέθοδο: $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ή υψηλότερη.

Η οπτική διαδρομή πρέπει να συντομεύεται με μείωση του όγκου των διαλυμάτων δοκιμής (στο εύρος τιμών 5-25 ml).

Απαιτείται επαρκής ανατάραξη (π.χ. με ήπια ανακίνηση) ώστε να επιτυγχάνεται υψηλή συχνότητα έκθεσης των φυκών σε υψηλή φωτεινή ακτινοβολία στην επιφάνεια της καλλιέργειας.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. ΧΑΡΑΞΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η βιομάζα των δοκιμαστικών δοχείων μπορεί να εκφράζεται σε μονάδες της υποκατάστατης παραμέτρου που έχει χρησιμοποιηθεί για τις μετρήσεις (π.χ. αριθμός κυττάρων, φθορισμός).

Καταχωρίζονται σε πίνακα οι υπολογισθείσες συγκεντρώσεις βιομάζας στις καλλιέργειες δοκιμής και στους μάρτυρες, καθώς και οι συγκεντρώσεις υλικού δοκιμής και οι χρόνοι μέτρησης, τουλάχιστον σε ακέραιες ώρες, για τη χάραξη των καμπυλών ανάπτυξης. Στο πρώτο αυτό στάδιο είναι χρήσιμη τόσο η λογαριθμική, όσο και η γραμμική κλίμακα, αλλά η λογαριθμική κλίμακα είναι υποχρεωτική και, γενικά, παρουσιάζει ακριβέστερα τις μεταβολές του τύπου ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Σημειωτέον ότι το λογαριθμικό διάγραμμα της εκθετικής ανάπτυξης έχει τη μορφή ευθείας γραμμής, της οποίας η κλίση παρέχει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.

Με τη βοήθεια των διαγραμμάτων, εξετάζεται αν η ανάπτυξη στις καλλιέργειες μάρτυρες είναι λογαριθμική με τον αναμενόμενο ρυθμό σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Εξετάζονται με κριτικό πνεύμα όλα τα σημεία δεδομένων, καθώς και η εμφάνιση των διαγραμμάτων και ελέγχεται η πιθανότητα σφαλμάτων στα ανεπεξέργαστα δεδομένα και στις διαδικασίες. Ειδικότερα, ελέγχονται τα σημεία δεδομένων που φαίνεται να αποκλίνουν λόγω συστηματικού σφάλματος. Εάν είναι προφανές ότι μπορούν να εντοπιστούν διαδικαστικά σφάλματα ή/και να θεωρηθούν εξαιρετικά πιθανά, τα αντίστοιχα σημεία δεδομένων σημειώνονται ως ακραίες τιμές και δεν λαμβάνονται υπόψη στη μετέπειτα στατιστική ανάλυση. (Η μηδενική συγκέντρωση φυκών σε ένα από τα δύο ή τρία δοχεία του πολλαπλού προσδιορισμού μπορεί να υποδηλώνει εσφαλμένο εμβολιασμό ή ελλιπή καθαρισμό του δοχείου). Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να αναφέρονται επακριβώς οι λόγοι απόρριψης ενός σημείου δεδομένων ως ακραίας τιμής. Αποδεκτοί λόγοι είναι μόνο τα (σπάνια) λάθη στη διαδικασία και όχι απλώς ο χαμηλός βαθμός ακρίβειας. Οι στατιστικές διαδικασίες για τον εντοπισμό των ακραίων τιμών έχουν περιορισμένη χρησιμότητα στην επίλυση προβλημάτων αυτού του είδους και δεν μπορούν να αντικαταστήσουν την κρίση του ειδικού. Οι ακραίες τιμές (σημειωμένες) θα πρέπει κατά προτίμηση να συμπεριλαμβάνονται στα σημεία δεδομένων που απεικονίζονται μεταγενέστερα σε γραφικές παραστάσεις ή πίνακες.

2.2. ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ

Η δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό των επιδράσεων της ελεγχόμενης ουσίας στην ανάπτυξη φυκών. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφονται δύο μεταβλητές απόκρισης, δεδομένου ότι τα κράτη μέλη έχουν διαφορετικές προτιμήσεις και κανονιστικές ανάγκες. Για να είναι τα αποτελέσματα των δοκιμών αποδεκτά σε όλα τα κράτη μέλη, οι επιδράσεις θα πρέπει να αξιολογούνται με χρήση και των δύο μεταβλητών απόκρισης α) και β) που περιγράφονται κατωτέρω.

- α) Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: αυτή η μεταβλητή απόκρισης υπολογίζεται με βάση τη λογαριθμική αύξηση της βιομάζας στη διάρκεια της δοκιμής, εκφραζόμενη ανά ημέρα.
- β) Απόδοση: αυτή η μεταβλητή απόκρισης ισούται με τη βιομάζα στο τέλος της δοκιμής μείον την αρχική βιομάζα.

Για την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου εντός του κανονιστικού πλαισίου της ΕΕ, ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων πρέπει να βασίζεται σε μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης για τους λόγους που εκτίθενται κατωτέρω. Σημειωτέον ότι οι τιμές τοξικότητας που υπολογίζονται με χρήση των ανωτέρω δύο μεταβλητών απόκρισης δεν είναι συγκρίσιμες και η διαφορά αυτή πρέπει να αναγνωρίζεται, όταν χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της δοκιμής. Εφόσον τηρούνται οι συνθήκες δοκιμής που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο, οι τιμές EC_{50} που προκύπτουν από τον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (E_{y,C_x}) είναι γενικά υψηλότερες από τα βασισόμενα στην απόδοση αποτελέσματα (E_{y,C_x}), λόγω της μαθηματικής βάσης της αντίστοιχης προσέγγισης. Αυτό δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως διαφορά ευαισθησίας μεταξύ των δύο μεταβλητών απόκρισης· πρόκειται απλώς για μαθηματική διαφορά τιμών. Η έννοια του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης βασίζεται στον γενικό λογαριθμικό τύπο ανάπτυξης των φυκών σε απεριόριστες καλλιέργειες, όπου η τοξικότητα εκτιμάται με βάση τις επιδράσεις στον ρυθμό ανάπτυξης, χωρίς να εξαρτάται από την απόλυτη τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μάρτυρα ούτε από την κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης ούτε από τη διάρκεια της δοκιμής. Αντίθετα, τα αποτελέσματα που βασίζονται στην απόδοση ως μεταβλητή απόκρισης εξαρτώνται από όλες τις προαναφερόμενες άλλες μεταβλητές. Η E_{y,C_x} εξαρτάται από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του είδους φυκών που χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμή, καθώς και από τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους. Η συγκεκριμένη μεταβλητή απόκρισης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη σύγκριση της ευαισθησίας διαφορετικών ειδών φυκών ή στελεχών του ίδιου είδους σε τοξικούς παράγοντες. Μολονότι είναι προτιμότερο, από επιστημονική άποψη, να χρησιμοποιείται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την εκτίμηση της τοξικότητας, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει και εκτιμήσεις της τοξικότητας με βάση την απόδοση, προκειμένου να καλυφθούν οι κανονιστικές απαιτήσεις που ισχύουν σήμερα σε ορισμένες χώρες.

2.2.1. Μέσος ρυθμός ανάπτυξης

Ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για συγκεκριμένη χρονική περίοδο υπολογίζεται ως η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας από την ακόλουθη εξίσωση, η οποία εφαρμόζεται σε κάθε μεμονωμένο δοχείο μάρτυρα και αγωγής:

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

όπου:

μ_{i-j} : μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα i έως j ,

X_i : η βιομάζα σε χρόνο i ,

X_j : η βιομάζα σε χρόνο j .

Για κάθε ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης.

Υπολογίζεται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για τη συνολική διάρκεια της δοκιμής (κατά κανόνα, ημέρες 0-3), με χρήση της ονομαστικής βιομάζας που εμβολιάστηκε ως αρχικής τιμής και όχι μετρηθείσας αρχικής τιμής, επειδή με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται συνήθως μεγαλύτερη ακρίβεια. Εάν ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της βιομάζας επιτρέπει τον αρκούτως ακριβή προσδιορισμό των χαμηλών συγκεντρώσεων βιομάζας εμβολιασμού (π.χ. κυτταρόμετρο ροής), μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση βιομάζας. Υπολογίζεται επίσης ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης, ως ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για κάθε ημέρα της περιόδου δοκιμής (ημέρες 0-1, 1-2 και 2-3) και εξετάζεται αν ο ρυθμός ανάπτυξης των μαρτύρων παραμένει σταθερός (βλέπε κριτήρια εγκυρότητας στο σημείο 1.7). Ένας ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, την πρώτη ημέρα, σημαντικά χαμηλότερος από το συνολικό μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μπορεί να αποτελεί ένδειξη λανθάνουσας φάσης. Ενώ στις καλλιέργειες μάρτυρες η λανθάνουσα φάση μπορεί να ελαχιστοποιηθεί και, πρακτικά, να εξαλειφθεί με κατάλληλο πολλαπλασιασμό της προκαλλιέργειας, η ίδια φάση στις εκτιθέμενες καλλιέργειες μπορεί να υποδηλώνει ανάκαμψη μετά από την πρώτη τοξική στρες ή ελαττωμένη έκθεση λόγω απώλειας της ελεγχόμενης ουσίας (όπου συμπεριλαμβάνεται η ρόφηση στη βιομάζα φυκών) μετά την αρχική έκθεση. Ως εκ τούτου, για την αξιολόγηση των επιδράσεων της ελεγχόμενης ουσίας στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, μπορεί να υπολογιστεί ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης. Ουσιαστικές διαφορές μεταξύ του τμηματικού και του μέσου ρυθμού ανάπτυξης υποδηλώνουν απόκλιση από τη σταθερή λογαριθμική ανάπτυξη και δικαιολογούν την ενδελεχή εξέταση των καμπυλών ανάπτυξης.

Υπολογίζεται η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης για καθένα από τα πολλαπλά δοχεία αγωγής από την εξίσωση:

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

όπου:

$\%I_r$: εκατοστιαία αναστολή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης,

μ_C : μέση τιμή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ) στην ομάδα μάρτυρα,

μ_T : μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στο δοχείο αγωγής.

Όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής, πρέπει να χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς της εκατοστιαίας αναστολής οι μάρτυρες με διαλύτη και όχι οι μάρτυρες χωρίς διαλύτη.

2.2.2. Απόδοση

Η απόδοση υπολογίζεται ως η διαφορά της βιομάζας στο τέλος της δοκιμής μείον την αρχική βιομάζα για κάθε μεμονωμένο δοχείο μάρτυρα και αγωγής. Για κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση και κάθε μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή της απόδοσης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης. Η εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης ($\%I_y$) μπορεί να υπολογιστεί για καθένα από τα πολλαπλά δοχεία αγωγής από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

$\%I_y$: εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης,

Y_C : μέση τιμή της απόδοσης στην ομάδα μάρτυρα,

Y_T : τιμή της απόδοσης στο δοχείο αγωγής.

2.3. ΧΑΡΑΞΗ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ-ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ

Σχεδιάζεται διάγραμμα της εκατοστιαίας αναστολής συναρτήσει του λογαρίθμου της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας. Το διάγραμμα αυτό εξετάζεται ενδελεχώς και απορρίπτονται τα σημεία δεδομένων που ενδεχομένως σημειώθηκαν ως ακραίες τιμές κατά το πρώτο στάδιο. Συνδέονται τα σημεία δεδομένων με ομαλή γραμμή, με το μάτι ή με παρεμβολή με τη βοήθεια υπολογιστή, ώστε να ληφθεί μια πρώτη εικόνα της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης και απόκρισης. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται λεπτομερέστερη μέθοδος, κατά προτίμηση στατιστική μέθοδος με υπολογιστή. Ανάλογα με τη σκοπούμενη χρήση, την ποιότητα (ακρίβεια) και τον όγκο των δεδομένων, καθώς και με τη διαθεσιμότητα εργαλείων ανάλυσης δεδομένων, είναι δυνατόν να αποφασιστεί (μερικές φορές δε, δικαιολογείται απόλυτα) να τερματιστεί η ανάλυση των δεδομένων στο στάδιο αυτό και, απλώς να ληφθούν οι βασικές τιμές EC_{50} και EC_{10} (ή/και EC_{20}) από την προσαρμοσμένη με το μάτι καμπύλη (βλέπε επίσης, κατωτέρω, το σημείο που πραγματεύεται τις διεγερτικές επιδράσεις). Βάσιμοι λόγοι για τη μη εφαρμογή στατιστικής μεθόδου μπορούν να είναι, μεταξύ άλλων, οι εξής:

- Τα δεδομένα δεν είναι κατάλληλα για να ληφθούν με μεθόδους με χρήση υπολογιστή πιο αξιόπιστα αποτελέσματα από εκείνα που αποδίδει η κρίση του ειδικού. Στις περιπτώσεις αυτές, μάλιστα, ορισμένα προγράμματα υπολογιστή ενδέχεται να μην προσφέρουν καν αξιόπιστη λύση (οι επαναλήψεις μπορεί να μην συγκλίνουν κ.λπ.).
- Οι αποκρίσεις ανάπτυξης που οφείλονται σε διέγερση δεν είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν επαρκώς με χρήση των διαθέσιμων προγραμμάτων υπολογιστή (βλέπε κατωτέρω).

2.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Το ζητούμενο είναι να ληφθεί ποσοτική σχέση συγκέντρωσης-απόδοσης με ανάλυση παλινδρόμησης. Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, μετά από γραμμικό μετασχηματισμό των δεδομένων απόκρισης, λόγω χάριν, σε μονάδες probit ή logit ή Weibull (9), αλλά προτιμώνται οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, με τις οποίες αντιμετωπίζονται καλύτερα οι αναπόφευκτες ανωμαλίες των δεδομένων και οι αποκλίσεις τους από τις ομαλές κατανομές. Στις περιοχές είτε της μηδενικής είτε της πλήρους αναστολής, οι ανωμαλίες αυτές ενδέχεται να μεγεθυνθούν από τον μετασχηματισμό και να παρεμποδίσουν την ανάλυση (9). Σημειώτεον ότι οι πρότυπες μέθοδοι ανάλυσης με χρήση αποτελεσμάτων μετασχηματισμού probit, logit ή Weibull προορίζονται για δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (π.χ. θνησιμότητα ή επιβίωση) και πρέπει να τροποποιούνται για να καλύψουν δεδομένα ανάπτυξης ή βιομάζας. Ειδικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό τιμών EC_x από συνεχή δεδομένα παρατίθενται στις δημοσιεύσεις (10) (11) και (12). Η χρήση της ανάλυσης με μη γραμμική παλινδρόμηση περιγράφεται λεπτομερέστερα στο προσάρτημα 4.

Για κάθε μεταβλητή απόκρισης που πρόκειται να αναλυθεί, χρησιμοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης για την εκτίμηση των σημείων των τιμών EC_x . Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να προσδιορίζονται, για κάθε εκτίμηση, τα όρια εμπιστοσύνης 95 %. Η καλή προσαρμογή των δεδομένων απόκρισης στο μοντέλο παλινδρόμησης θα πρέπει να αξιολογείται με γραφική ή στατιστική μέθοδο. Η ανάλυση παλινδρόμησης θα πρέπει να εκτελείται με χρήση των αποκρίσεων στα επιμέρους δοχεία αγωγής και όχι των μέσων όρων των ομάδων αγωγής. Εάν, ωστόσο, η μη γραμμική προσαρμογή καμπύλης είναι δύσκολη ή ανέφικτη, λόγω υπερβολικής σκεδαστικότητας των δεδομένων, το πρόβλημα μπορεί να παρακαμφθεί με την εφαρμογή της παλινδρόμησης σε μέσους όρους ομάδας ως πρακτικό μέσο περιορισμού της επιρροής των ύποπτων ακραίων τιμών. Η χρήση αυτής της εναλλακτικής επιλογής θα πρέπει να αναφέρεται στην έκθεση δοκιμής ως παρέκκλιση από την κανονική διαδικασία, οφειλόμενη στο γεγονός ότι οι προσαρμογές καμπυλών με τα δεδομένα των επιμέρους δοχείων αγωγής δεν απέδωσαν ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

Εάν τα διαθέσιμα μοντέλα/μέθοδοι παλινδρόμησης είναι ακατάλληλα για τα δεδομένα, μπορούν επίσης να ληφθούν εκτιμήσεις και όρια εμπιστοσύνης για την EC_{50} με γραμμική παρεμβολή με τεχνικές εύρεσης εκτιμητριών bootstrap (13).

Για την εκτίμηση της LOEC και, κατ' επέκταση της NOEC, καθώς και των επιδράσεων της ελεγχόμενης ουσίας στον ρυθμό ανάπτυξης, είναι αναγκαία η σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων αγωγής με τεχνικές ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA). Στη συνέχεια, ο μέσος όρος για κάθε συγκέντρωση πρέπει να συγκρίνεται με τον μέσο όρο του μάρτυρα με κατάλληλη μέθοδο πολλαπλής σύγκρισης ή δοκιμής τάσης. Χρήσιμη για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η δοκιμή του Dunnett ή του Williams (14) (15) (16) (17) (18). Είναι απαραίτητο να εκτιμάται αν ευσταθεί η παραδοχή της ANOVA για ομοιογενή διακύμανση. Η εκτίμηση αυτή μπορεί να διενεργηθεί γραφικά ή με επίσημη δοκιμή (18). Κατάλληλες σχετικές δοκιμές είναι εκείνες του Levene και του Bartlett. Εάν δεν ισχύει η παραδοχή της ομοιογένειας της διακύμανσης, αυτό είναι μερικές φορές δυνατόν να διορθωθεί με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Στις περιπτώσεις ακραίας ετερογένειας της διακύμανσης, η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί με μετασχηματισμό, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης με μεθόδους όπως οι μειωτικές δοκιμές τάσης του Jonkheere. Πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με τον προσδιορισμό της NOEC παρέχεται στη δημοσίευση (12).

Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις υπαγόρευαν τη σύσταση να εγκαταλειφθεί η έννοια της NOEC και να αντικατασταθεί από εκτιμήσεις των σημείων των τιμών EC_x βάσει παλινδρόμησης. Δεν έχει καθοριστεί κατάλληλη τιμή του x για την παρούσα δοκιμή σε φύκη. Φαίνεται να ενδείκνυται ένα εύρος 10 έως 20 % (ανάλογα με την επιλεγμένη μεταβλητή απόκρισης), κατά προτίμηση μάλιστα, θα πρέπει να αναφέρονται τόσο η EC_{10} όσο και η EC_{20} .

2.5. ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Μερικές φορές παρατηρείται διέγερση της ανάπτυξης (αρνητική αναστολή) σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε όρμηση (hoimesis, «τοξική διέγερση») είτε στην προσθήκη διεγερτικών αυξητικών παραγόντων στο χρησιμοποιούμενο υλικό ελαχίστων θρεπτικών στοιχείων μέσω του υλικού δοκιμής. Σημειωτέον ότι η προσθήκη ανόργανων θρεπτικών στοιχείων δεν προβλέπεται να έχει άμεση επίδραση, επειδή το υλικό δοκιμής διατηρεί περίσσεια θρεπτικών στοιχείων σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Εάν η διέγερση σε χαμηλή δόση δεν είναι ακραία, συνήθως μπορεί να αγνοηθεί στους υπολογισμούς της EC_{50} . Εάν όμως είναι ακραία ή εάν πρόκειται να υπολογιστεί τιμή EC_x για χαμηλή τιμή του x , ενδέχεται να χρειαστούν ειδικές διαδικασίες. Η απαλοιφή των αποκρίσεων διέγερσης από την ανάλυση δεδομένων πρέπει, κατά το δυνατόν, να αποφεύγεται και, εάν το διαθέσιμο λογισμικό προσαρμογής καμπυλών δεν μπορεί να δεχθεί ελάσσονα διέγερση, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η γραμμική παρεμβολή με τεχνική εύρεσης εκτιμητηρίων bootstrap. Σε περίπτωση ακραίας διέγερσης, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης μοντέλου όρμησης (19).

2.6. ΜΗ ΤΟΞΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Τα υλικά δοκιμής που απορροφούν το φως μπορούν να προκαλέσουν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, επειδή η σκίαση περιορίζει τη διαθέσιμη ποσότητα φωτός. Αυτά τα είδη επιδράσεων, που οφείλονται σε φυσικά αίτια, θα πρέπει να διαχωρίζονται από τις τοξικές επιδράσεις με τροποποίηση των συνθηκών δοκιμής και να αναφέρονται χωριστά. Σχετική καθοδήγηση παρέχεται στις δημοσιεύσεις (2) και (3).

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

- φυσική υπόσταση και σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του ορίου υδατοδιαλυτότητας,
- δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας.

Είδος οργανισμού δοκιμής:

- στέλεχος, προμηθευτής ή πηγή και χρησιμοποιηθείσες συνθήκες καλλιέργειας.

Συνθήκες δοκιμής:

- ημερομηνία έναρξης και διάρκεια της δοκιμής,
- περιγραφή του σχεδιασμού της δοκιμής: δοκιμαστικά δοχεία, όγκοι καλλιεργείων, πυκνότητα βιομάζας στην αρχή της δοκιμής,
- σύσταση του θρεπτικού υλικού,
- συγκεντρώσεις δοκιμής και πολλαπλοί προσδιορισμοί (π.χ. πλήθος προσδιορισμών, πλήθος συγκεντρώσεων δοκιμής και χρησιμοποιηθείσα γεωμετρική πρόοδος),
- περιγραφή της παρασκευής των διαλυμάτων δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης διαλυτών κ.λπ.,
- συσκευή καλλιέργειας,
- ένταση και ποιότητα του φωτός (πηγή, ομοιογένεια),
- θερμοκρασία,
- ελεγχθείσες συγκεντρώσεις: ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής και αποτελέσματα των ενδεχόμενων αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στα δοκιμαστικά δοχεία· θα πρέπει επίσης να αναφέρονται η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού στην ύλη της δοκιμής,
- όλες οι παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο δοκιμών,

- μέθοδος προσδιορισμού της βιομάζας και απόδειξη συσχέτισης της μετρούμενης παραμέτρου με το ξηρό βάρος.

Αποτελέσματα:

- τιμές pH στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής σε κάθε αγωγή,
- βιομάζα κάθε φιάλης σε κάθε σημείο μέτρησης και μέθοδος μέτρησης της βιομάζας,
- καμπύλες ανάπτυξης (διάγραμμα της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου),
- υπολογισθείσες μεταβλητές απόκρισης για καθένα από τα πολλαπλά δοχεία αγωγής, συνοδευόμενες από τους μέσους όρους και το συντελεστή μεταβολής για τους πολλαπλούς προσδιορισμούς,
- γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης,
- εκτιμήσεις της τοξικότητας για τις μεταβλητές απόκρισης, π.χ. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀ και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές LOEC and NOEC, εφόσον έχουν υπολογιστεί, και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό αυτό,
- εάν έχει χρησιμοποιηθεί τεχνική ANOVA, το ανιχνεύσιμο μέγεθος της επίδρασης (π.χ. η ελάχιστη σημαντική διαφορά),
- διέγερση της ανάπτυξης που ενδεχομένως διαπιστώθηκε σε ομάδα αγωγής,
- τυχόν άλλες παρατηρηθείσες επιδράσεις, π.χ. μορφολογικές αλλαγές στα φύκη,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων, όπου συμπεριλαμβάνεται η ενδεχόμενη επίδραση παρεκκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στα αποτελέσματα της δοκιμής.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test
- (2) ISO 1998: Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442
- (3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23
- (4) ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16 (Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 5667-16: Ποιότητα νερού — Δειγματοληψία — Μέρος 16: Καθοδήγηση για βιοδοκιμασίες δειγμάτων)
- (5) ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692 (Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 8692: Ποιότητα νερού — Δοκιμή παρεμπόδισης ανάπτυξης αλγών γλυκού νερού με μονοκυτταρικές πράσινες άλγες)
- (6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531
- (7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22,5 (1977), pp.919-925
- (8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem* 22, 2073-2079
- (9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718
- (10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167
- (11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Env. Toxicol. Chem.* 11:1485-1494
- (12) OECD (2004): Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data

- (13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN
 - (14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121
 - (15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491
 - (16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117
 - (17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531
 - (18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York
 - (19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96
-

Προσάρτημα 1

Στελέχη που έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για τη δοκιμή

Πράσινα φύκη

- *Pseudokirchneriella subcapitata* (παλαιότερα γνωστό ως *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG
- *Desmodesmus subspicatus* (παλαιότερα γνωστό ως *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Διάτομα

- *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Κυανοβακτηρίδια

- *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A
- *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Πηγές στελεχών

Τα συνιστώμενα στελέχη διατίθενται ως μονοκαλλιέργειες φυκών από τις ακόλουθες συλλογές (με αλφαβητική σειρά):

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, Ambleside
Cumbria
LA22 0LP
UK

SAG: Sammlung von Algenkulturen
Albrecht-von-Haller Institut
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
D-3400 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

Εμφάνιση και χαρακτηριστικά των συνιστώμενων ειδών οργανισμών

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Εμφάνιση	Καμπύλα, συστρεμμένα μεμονωμένα κύτταρα	Ωσειδή, ως επί το πλείστον μεμονωμένα κύτταρα	Ραβδία	Αλυσίδες ωσειδών κυττάρων	Ραβδία
Διαστάσεις (μήκος × πλάτος) μm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Κυτταρικός όγκος (μm ³ /κύτταρο)	40-60 ⁽¹⁾	60-80 ⁽¹⁾	40-50 ⁽¹⁾	30-40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Κυτταρικό ξηρό βάρος (mg/κύτταρο)	2-3 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	1-2 × 10 ⁻⁸	2-3 × 10 ⁻⁹
Ρυθμός ανάπτυξης ⁽³⁾ (ημέρα ⁻¹)	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

⁽¹⁾ Μετρούμενος με ηλεκτρονικό απεικονιστικό σωματιδίον.

⁽²⁾ Υπολογιζόμενος από τις διαστάσεις.

⁽³⁾ Ο συνηθέστερα παρατηρούμενος ρυθμός ανάπτυξης στο θρεπτικό υλικό του ΟΟΣΑ, με φωτεινή ένταση 70 μE·m⁻²·s⁻¹ περίπου και σε θερμοκρασία 21 °C.

Ειδικές συστάσεις για την καλλιέργεια και τη μεταχείριση των συνιστώμενων ειδών οργανισμού δοκιμής*Pseudokirchneriella subcapitata* και *Desmodesmus subspicatus*

Τα συγκεκριμένα πράσινα φύκη είναι γενικά εύκολο να διατηρηθούν σε διάφορα θρεπτικά υλικά. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα υλικά διατίθενται από τις συλλογές καλλιέργειών. Τα κύτταρα είναι κατά κανόνα μεμονωμένα, ενώ η κυτταρική πυκνότητα μπορεί να μετρηθεί εύκολα με ηλεκτρονικό απαριθμητή σωματιδίων ή μικροσκόπιο.

Anabaena flos-aquae

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά υλικά για τη διατήρηση μητρικών καλλιέργειών. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να μην αφήνεται η καλλιέργεια κατά παρτίδες να αναπτυχθεί πέραν της λογαριθμικής φάσης κατά την ανανέωση, επειδή η ανάκαμψη είναι δύσκολη στο σημείο αυτό.

Το *Anabaena flos-aquae* αναπτύσσεται σε συσσωματώματα από επικαλυπτόμενες αλυσίδες κυττάρων. Το μέγεθος των συσσωματωμάτων αυτών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Όταν χρησιμοποιείται μικροσκοπική καταμέτρηση ή ηλεκτρονικός απαριθμητής σωματιδίων για τον προσδιορισμό της βιομάζας, ενδέχεται να απαιτείται θραύση των εν λόγω συσσωματωμάτων.

Για τη θραύση των αλυσίδων, προκειμένου να μειωθεί η μεταβλητότητα του αριθμού κυττάρων, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η επίδραση ηχητικών κυμάτων. Η εφαρμογή ηχητικών κυμάτων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το απαιτούμενο για τη θραύση των αλυσίδων σε μικρότερα τεμάχια είναι δυνατόν να καταστρέψει τα κύτταρα. Η ένταση των ηχητικών κυμάτων και η διάρκεια της επίδρασής τους πρέπει να είναι πανομοιότυπα σε κάθε αγωγή.

Καταμετρώνται στο αιμοκυτταρόμετρο αρκετά πεδία (τουλάχιστον 400 κύτταρα) για να διευκολυνθεί η αντιστάθμιση της μεταβλητότητας. Με τον τρόπο αυτό, βελτιώνεται η αξιοπιστία των μικροσκοπικών προσδιορισμών της πυκνότητας.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ηλεκτρονικός απαριθμητής σωματιδίων για τον προσδιορισμό του συνολικού κυτταρικού όγκου των φυκών *Anabaena*, μετά τη θραύση των αλυσίδων κυττάρων με επιμελή εφαρμογή ηχητικών κυμάτων. Η ενέργεια των ηχητικών κυμάτων πρέπει να ρυθμίζεται για τη αποτροπή της διάρρηξης των κυττάρων.

Χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας (vortex) ή ανάλογη κατάλληλη μέθοδος για να εξασφαλιστούν η καλή ανάμιξη και η ομοιογένεια του εναιωρήματος φυκών με το οποίο εμβολιάζονται τα δοκιμαστικά δοχεία.

Τα δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να τοποθετούνται σε περιστροφικές ή παλινδρομικές τράπεζες ανακίνησης, ρυθμισμένες σε ταχύτητα περίπου 150 rpm. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η περιοδική ανακίνηση για τον περιορισμό της τάσης του *Anabaena* να σχηματίζει συστάδες. Εάν σχηματιστούν συστάδες, πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε τα δείγματα για τις μετρήσεις της βιομάζας να είναι αντιπροσωπευτικά. Για τη διάσπαση των συστάδων των φυκών, μπορεί να χρειαστεί ζωρή ανακίνηση πριν από τη δειγματοληψία.

Synechococcus leopoliensis

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά υλικά για τη διατήρηση μητρικών καλλιέργειών. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα υλικά διατίθενται από τις συλλογές καλλιέργειών.

Το *Synechococcus leopoliensis* αναπτύσσεται σε μεμονωμένα ραβδοειδή κύτταρα. Τα κύτταρα είναι πολύ μικρά, γεγονός που περιπλέκει τη χρήση μικροσκοπικής καταμέτρησης για τον προσδιορισμό της βιομάζας. Οι ηλεκτρονικοί απαριθμητές σωματιδίων που είναι κατάλληλα εξοπλισμένοι για την καταμέτρηση σωματιδίων μεγέθους 1 μm περίπου είναι χρήσιμοι. Μπορούν επίσης να εφαρμοστούν οι μετρήσεις φθορισμού *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά υλικά για τη διατήρηση μητρικών καλλιέργειών. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα υλικά διατίθενται από τις συλλογές καλλιέργειών. Σημειώτεον ότι το θρεπτικό υλικό απαιτείται να περιέχει πυριτικό άλας.

Το *Navicula pelliculosa* ενδέχεται να σχηματίσει συσσωματώματα σε ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας. Λόγω της παραγωγής λιπιδίων, τα κύτταρα των φυκών τείνουν μερικές φορές να συσσωρεύονται στο επιφανειακό υμένιο. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να εφαρμόζονται ειδικά μέτρα κατά τη λήψη των μερικών δειγμάτων για τον προσδιορισμό της βιομάζας, ώστε τα δείγματα να είναι αντιπροσωπευτικά. Ενδέχεται να απαιτείται ζωρή ανατάραξη, π.χ. με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα.

Προσάρτημα 2

Θρεπτικά υλικά

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα από τα ακόλουθα δύο θρεπτικά υλικά:

το υλικό του ΟΟΣΑ: το πρωτότυπο υλικό της κατευθυντήριας γραμμής TG 201 του ΟΟΣΑ, σύμφωνα επίσης με το πρότυπο ISO 8692·

το υλικό ΑΑΡ της ΕΡΑ (Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Η.Π.Α.), σύμφωνα επίσης με τα πρότυπα ASTM.

Κατά την παρασκευή των ανωτέρω υλικών, πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής καθαρότητας και απιονισμένο νερό.

Σύσταση του υλικού ΑΑΡ (US. ΕΡΑ) και του υλικού TG 201 του ΟΟΣΑ

Συστατικό	ΕΡΑ		ΟΟΣΑ	
	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	

(*) Η μοριακή αναλογία EDTA προς σίδηρο υπερβαίνει ελαφρά τη μονάδα. Με τον τρόπο αυτό, αποτρέπεται η καθίζηση σιδήρου και, ταυτόχρονα, ελαχιστοποιείται ο σχηματισμός χηλικών συμπλόκων των ιόντων βαρέων μετάλλων.

Στη δοκιμή με το διάτομο *Navicula pelliculosa*, πρέπει να προστίθεται Na₂SiO₃·9H₂O και στα δύο μέσα, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 1,4 mg Si/l.

Το pH του θρεπτικού υλικού επιτυγχάνεται στην κατάσταση ισορροπίας μεταξύ του ανθρακικού συστήματος του υλικού και της μερικής πίεσης του CO₂ στον ατμοσφαιρικό αέρα. Το pH στους 25 °C συνδέεται, κατά προσέγγιση, με τη μοριακή συγκέντρωση όξινων ανθρακικών ιόντων με τη σχέση:

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

Με 15 mg NaHCO₃/l, επιτυγχάνεται pH_{eq} = 7,5 (θρεπτικό υλικό της ΕΡΑ), ενώ με 50 mg NaHCO₃/l, pH_{eq} = 8,1 (υλικό του ΟΟΣΑ).

Στοιχειακή σύνθεση των θρεπτικών υλικών

Στοιχείο	ΕΡΑ	ΟΟΣΑ
	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

Παρασκευή του θρεπτικού υλικού του ΟΟΣΑ

Θρεπτικό στοιχείο	Συγκέντρωση στο μητρικό διάλυμα
Μητρικό διάλυμα 1: μακροθρεπτικά συστατικά	
NH ₄ Cl	1,5 g·l ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g·l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g·l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,16 g·l ⁻¹
Μητρικό διάλυμα 2: σίδηρος	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg·l ⁻¹
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg·l ⁻¹
Μητρικό διάλυμα 3: ιχνοστοιχεία	
H ₃ BO ₃	185 mg·l ⁻¹
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg·l ⁻¹
ZnCl ₂	3 mg·l ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg·l ⁻¹
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg·l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg·l ⁻¹
Μητρικό διάλυμα 4: όξινο ανθρακικό άλας	
NaHCO ₃	50 g·l ⁻¹
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	

Τα μητρικά διαλύματα αποστειρώνονται με διήθηση μέσω μεμβράνης (μέση διάμετρος πόρων 0,2 μm) ή σε αυτόκαυστο (120 °C, 15 λεπτά). Τα διαλύματα φυλάσσονται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία 4 °C.

Τα μητρικά διαλύματα 2 και 4 πρέπει να μην αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο, αλλά με διήθηση μέσω μεμβράνης.

Παρασκευάζεται θρεπτικό υλικό με την προσθήκη κατάλληλων όγκων μητρικών διαλυμάτων 1-4 σε νερό:

Σε 500 ml αποστειρωμένου νερού, προστίθενται:

- 10 ml μητρικού διαλύματος 1,
- 1 ml μητρικού διαλύματος 2,
- 1 ml μητρικού διαλύματος 3,
- 1 ml μητρικού διαλύματος 4.

Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με αποστειρωμένο νερό.

Το υλικό αφήνεται να φθάσει σε κατάσταση ισορροπίας με το ατμοσφαιρικό CO₂ για επαρκή χρόνο — εάν είναι απαραίτητο, με τη διοχέτευση φυσαλίδων στείρου φιλτραρισμένου αέρα για μερικές ώρες.

Παρασκευή του θρεπτικού υλικού της ΕΡΑ

A1.1. Σε περίπου 900 ml αποιονισμένου ή απεσταγμένου νερού, προστίθεται 1 ml από κάθε μητρικό διάλυμα A1.2.1–A1.2.7 και το σύνολο αραιώνεται μέχρι το 1 λίτρο.

A1.2. Τα μητρικά διαλύματα μακροθρεπτικών συστατικών παρασκευάζονται με διάλυση των ακόλουθων ουσιών σε 500 ml αποιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Τα αντιδραστήρια A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 και A1.2.4 είναι δυνατόν να συνδυαστούν σε ένα ενιαίο μητρικό διάλυμα.

A1.2.1. NaNO₃-12,750 g,

A1.2.2. MgCl₂·6H₂O — 6,082 g,

A1.2.3. CaCl₂·2H₂O — 2,205 g.

A1.2.4. Μητρικό διάλυμα μικροθρεπτικών συστατικών (βλέπε παράγραφο A1.3)

A1.2.5. MgSO₄·7H₂O — 7, 50 g,

A1.2.6. K₂HPO₄-0,522 g,

A1.2.7. NaHCO₃-7,500 g,

A1.2.8. Na₂SiO₃·9H₂O — Βλέπε σημείωση A1.1.

Σημ. A.1.1 — Χρησιμοποιείται μόνο για τα είδη διατόμων. Μπορεί να προστίθεται κατευθείαν (202,4 mg) ή μέσω μητρικού διαλύματος, κατά τρόπο ώστε η τελική συγκέντρωση Si στο υλικό να είναι 20 mg/l.

A1.3. Το μητρικό διάλυμα μικροθρεπτικών συστατικών παρασκευάζεται με διάλυση των ακόλουθων ουσιών σε 500 ml αποιονισμένου ή απεσταγμένου νερού:

A1.3.1. H₃BO₃ — 92,760 mg,

A1.3.2. MnCl₂·4H₂O — 207,690 mg,

A1.3.3. ZnCl₂ — 1,635 mg,

A1.3.4. FeCl₃·6H₂O — 79,880 mg,

A1.3.5. CoCl₂·6H₂O — 0,714 mg,

A1.3.6. Na₂MoO₄·2H₂O — 3,630 mg,

A1.3.7. CuCl₂·2H₂O — 0,006 mg,

A1.3.8. Na₂EDTA·2H₂O — 150,000 mg

[(αιθυλενοδιητρίλο)τετραοξικό νάτριο],

A1.3.9. Na₂SeO₄·5H₂O — 0,005 mg — Βλέπε σημείωση A1.2.

Σημ. A.1.2 — Χρησιμοποιείται μόνο στο θρεπτικό υλικό για μητρικές καλλιέργειες ειδών διατόμων.

A1.4. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7,5 ± 0,1 με διάλυμα NaOH ή HCl 0,1 N ή 1,0 N.

A1.5. Το υλικό διηθείται σε στείρο υποδοχέα μέσω είτε διηθητικής μεμβράνης των 0,22 μm, εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί απαριθμητής σωματιδίων, είτε ηθμού των 0,45 μm, εάν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί απαριθμητής σωματιδίων.

A1.6. Μέχρι να χρησιμοποιηθεί, το υλικό φυλάσσεται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία περίπου 4 °C.

Προσάρτημα 3

Παράδειγμα διαδικασίας καλλιέργειας φυκών

Γενικές παρατηρήσεις

Σκοπός της καλλιέργειας με τη διαδικασία που ακολουθεί είναι να ληφθούν καλλιέργειες φυκών για δοκιμές τοξικότητας.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι για να εξασφαλίζεται ότι οι καλλιέργειες φυκών δεν θα μολυνθούν από βακτηρίδια. Μπορεί να είναι επιθυμητές οι αξενικές (χωρίς παρουσία ξένων οργανισμών) καλλιέργειες, αλλά πρέπει να παρασκευάζονται και να χρησιμοποιούνται μονοκαλλιέργειες φυκών.

Όλες οι εργασίες πρέπει να εκτελούνται σε στείρες συνθήκες για να αποφεύγεται η μόλυνση με βακτηρίδια και άλλα φύκη.

Εξοπλισμός και υλικά

Βλέπε μέθοδο δοκιμών, σημείο «Εργαστηριακά σκεύη και όργανα».

Διαδικασίες για λήψη καλλιεργείων φυκών

Παρασκευή διαλυμάτων θρεπτικών στοιχείων (θρεπτικά υλικά):

Όλα τα θρεπτικά άλατα του υλικού παρασκευάζονται ως πυκνά μητρικά διαλύματα και αποθηκεύονται στο σκοτάδι και υπό ψύξη. Τα διαλύματα αυτά αποστειρώνονται με διήθηση ή σε αυτόκαυστο.

Το υλικό παρασκευάζεται με την προσθήκη της ενδεδειγμένης ποσότητας μητρικού διαλύματος σε στείρο απεσταγμένο νερό, με μέριμνα για την αποφυγή μολύνσεων. Προκειμένου για στερεό θρεπτικό υλικό, προστίθεται άγαρ σε αναλογία 0,8 %.

Μητρική καλλιέργεια:

Οι μητρικές καλλιέργειες είναι μικρές καλλιέργειες φυκών που μεταφέρονται τακτικά σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό για να δράσουν ως αρχικό υλικό δοκιμής. Εάν οι καλλιέργειες δεν χρησιμοποιούνται τακτικά, απλώνονται σε σωλήνες με άγαρ υπό κλίση. Μεταφέρονται σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό τουλάχιστον ανά δίμηνο.

Οι μητρικές καλλιέργειες αναπτύσσονται σε κωνικές φιάλες που περιέχουν το κατάλληλο θρεπτικό υλικό (όγκος περίπου 100 ml). Όταν τα φύκη επωάζονται στους 20 °C με συνεχή φωτισμό, απαιτείται εβδομαδιαία μεταφορά.

Κατά τη μεταφορά, ποσότητα «παλαιάς» καλλιέργειας μεταγγίζεται με αποστειρωμένα σιφόνια σε φιάλη που περιέχει πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό, κατά τρόπο ώστε, προκειμένου για ειδή ταχείας ανάπτυξης, η αρχική συγκέντρωση να είναι περίπου 100 φορές μικρότερη από εκείνη της παλαιάς καλλιέργειας.

Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός είδους μπορεί να προσδιοριστεί από την καμπύλη ανάπτυξης. Εάν αυτή είναι γνωστή, μπορεί να εκτιμηθεί η πυκνότητα στην οποία η καλλιέργεια θα πρέπει να μεταφερθεί σε νέο θρεπτικό υλικό. Ο σχετικός υπολογισμός πρέπει να γίνεται πριν η καλλιέργεια φθάσει στη φάση θανάτου.

Προκαλλιέργεια:

Η προκαλλιέργεια προορίζεται να προσφέρει την κατάλληλη ποσότητα φυκών για τον εμβολιασμό των καλλιεργείων δοκιμής. Η προκαλλιέργεια επωάζεται στις συνθήκες δοκιμής και χρησιμοποιείται ενώ βρίσκεται ακόμη στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, κατά κανόνα μετά από περίοδο επώασης 2-4 ημερών. Όταν οι καλλιέργειες φυκών περιέχουν παραμορφωμένα ή ανώμαλα κύτταρα, πρέπει να απορρίπτονται.

Προσάρτημα 4

Ανάλυση δεδομένων με μη γραμμική παλινδρόμηση

Γενικά

Η απόκριση στις δοκιμές σε φύκη και στις λοιπές δοκιμές μικροβιακής ανάπτυξης — η αύξηση της βιομάζας — είναι εκ φύσεως συνεχής ή μετρική μεταβλητή: συνίσταται σε ταχύτητα διεργασίας, εάν χρησιμοποιείται ο ρυθμός ανάπτυξης και στο ολοκλήρωμά της ως προς τον χρόνο, εάν έχει επιλεγεί η βιομάζα. Και τα δύο συσχετίζονται με τον αντίστοιχο μέσο όρο της απόκρισης πολλαπλών καλλιεργειών μαρτύρων, οι οποίες δεν εκτίθενται και παρουσιάζουν μέγιστη απόκριση στις επιβαλλόμενες συνθήκες — κατά τη δοκιμή σε φύκη, το φως και η θερμοκρασία αποτελούν τους πρωταρχικούς καθοριστικούς παράγοντες. Το σύστημα είναι κατανομημένο ή ομοιογενές, ενώ η βιομάζα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα συνεχές, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τα επιμέρους κύτταρα. Για το σύστημα αυτό, η κατανομή της διακύμανσης του τύπου απόκρισης συνδέεται μόνο με τους πειραματικούς παράγοντες (περιγράφεται τυπικά από τη λογαριθμοκανονική ή την κανονική κατανομή του σφάλματος). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις τυπικές αποκρίσεις των βιοδοκιμασιών με δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (quantal), όπου η ανοχή (με τυπική διωνυμική κατανομή) των επιμέρους οργανισμών υποτίθεται συχνά ότι είναι η κυρίαρχη συνιστώσα της διακύμανσης. Οι αποκρίσεις του μάρτυρα, εν προκειμένω, είναι μηδέν ή επίπεδο υποβάθρου.

Στη μη πεπλεγμένη κατάσταση, η κανονικοποιημένη ή σχετική απόκριση, r , μειώνεται με μονοτονία από το 1 (μηδενική αναστολή) έως το 0 (100 % αναστολή). Σημειώτεον ότι όλες οι αποκρίσεις έχουν σφάλμα και ότι φαινόμενη αρνητική αναστολή είναι δυνατόν να υπολογιστεί μόνο ως επακόλουθο τυχαίου σφάλματος.

Ανάλυση παλινδρόμησης

Μοντέλα

Η ανάλυση παλινδρόμησης αποσκοπεί στην ποσοτική περιγραφή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης με μαθηματική συνάρτηση παλινδρόμησης, που έχει τη μορφή $Y = f(C)$ ή, συνηθέστερα, $F(Z)$, όπου $Z = \log C$. Η εφαρμογή της αντίστροφης συνάρτησης, $C = f^{-1}(Y)$, επιτρέπει τον υπολογισμό τιμών EC_x , μεταξύ των οποίων οι EC_{50} , EC_{10} και EC_{20} , καθώς και των οικείων ορίων εμπιστοσύνης 95 %. Έχει αποδειχθεί ότι οι σχέσεις συγκέντρωσης-απόκρισης που προκύπτουν από τις δοκιμές αναστολής της ανάπτυξης φυκών περιγράφονται επιτυχώς από διάφορες απλές μαθηματικές συναρτήσεις. Στις τελευταίες περιλαμβάνονται, λόγω χάριν, η λογιστική εξίσωση, η ασύμμετρη εξίσωση του Weibull και η συνάρτηση της λογαριθμοκανονικής κατανομής — όλες σιγμοειδείς καμπύλες που τείνουν ασυμπτωτικά προς το 1, όταν $C \rightarrow 0$, και προς το μηδέν, όταν $C \rightarrow \infty$.

Τελευταία, προτείνεται η χρήση μοντέλων συνεχούς συνάρτησης ορίου (π.χ. μοντέλο Kooijman για την αναστολή της ανάπτυξης πληθυσμού — «for inhibition of population growth» Kooijman et al. 1996) αντί των ασυμπτωτικών μοντέλων. Τα μοντέλα αυτά βασίζονται στην υπόθεση ότι δεν υπάρχουν επιδράσεις σε συγκεντρώσεις κάτω από ένα όριο, EC_{0+} , το οποίο υπολογίζεται με παρεκβολή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης μέχρι να τέμνει τον άξονα των συγκεντρώσεων, με την εφαρμογή απλής συνεχούς συνάρτησης που δεν είναι διαφορίσιμη στο αρχικό σημείο.

Σημειώτεον ότι η ανάλυση μπορεί να συνίσταται σε απλή ελαχιστοποίηση των αθροισμάτων των τετραγώνων των καταλοίπων (με την παραδοχή σταθερής διακύμανσης) ή των σταθμισμένων τετραγώνων, εάν αντισταθμίζεται η ετερογένεια της διακύμανσης.

Διαδικασία

Η διαδικασία μπορεί να συνοψιστεί ως εξής: επιλέγεται η κατάλληλη συναρτησιακή εξίσωση, $Y = f(C)$, και προσαρμόζεται στα δεδομένα με μη γραμμική παλινδρόμηση. Χρησιμοποιούνται, κατά προτίμηση, οι μετρηθείσες τιμές για κάθε επιμέρους φιάλη αντί των μέσων τιμών των πολλαπλών φιαλών, ώστε να ληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες από τα δεδομένα. Αντίθετα, σε περίπτωση μεγάλης διακύμανσης, η πρακτική εμπειρία έχει δείξει ότι οι μέσες τιμές των πολλαπλών φιαλών είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε ακριβέστερη μαθηματική εκτίμηση, επηρεαζόμενη σε μικρότερο βαθμό από τα τυχαία σφάλματα των δεδομένων, απ' ό,τι η εκτίμηση με κάθε επιμέρους σημείο δεδομένων που έγινε δεκτό.

Σχεδιάζεται το διάγραμμα της προσαρμοσμένης καμπύλης και των δεδομένων των μετρήσεων και εξετάζεται κατά πόσον η προσαρμογή της καμπύλης είναι η ενδεδειγμένη. Ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η ανάλυση των καταλοίπων. Εάν η συναρτησιακή σχέση που επιλέχθηκε για την προσαρμογή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης δεν περιγράφει ικανοποιητικά το σύνολο της εν λόγω καμπύλης ή κάποιο ουσιώδες τμήμα της, λόγω χάριν την απόκριση σε χαμηλές συγκεντρώσεις, επιλέγεται άλλη δυνατότητα προσαρμογής — π.χ. ασύμμετρη καμπύλη, όπως η συνάρτηση Weibull, αντί της συμμετρικής. Η αρνητική αναστολή ενδέχεται να αποτελέσει πρόβλημα, για παράδειγμα με τη συνάρτηση της λογαριθμοκανονικής κατανομής, το οποίο

απαιτεί ομοίως εναλλακτική συνάρτηση παλινδρόμησης. Δεν συνιστάται να δίδεται στις αρνητικές αυτές τιμές η τιμή μηδέν ή μικρή θετική τιμή, διότι αυτό στρεβλώνει την κατανομή του σφάλματος. Για τον υπολογισμό των τιμών $EC_{\text{χαμηλό } x}$ μπορεί να ενδεικνύονται χωριστές προσαρμογές σε τμήματα της καμπύλης, όπως εκείνο που αντιστοιχεί στο χαμηλό επίπεδο αναστολής. Από την προσαρμοσμένη εξίσωση υπολογίζονται [με «αντίστροφη επίλυση», $C = f^{-1}(Y)$] χαρακτηριστικές τιμές σημείου EC_x και αναφέρονται, τουλάχιστον, η EC_{50} και μία ή δύο $EC_{\text{χαμηλό } x}$. Η πρακτική εμπειρία από τη διενέργεια δοκιμών έχει δείξει ότι, κατά κανόνα, η ακρίβεια της μεθόδου δοκιμών σε φύκη επιτρέπει εύλογα ακριβείς εκτιμήσεις στο επίπεδο αναστολής 10 %, εφόσον επαρκούν τα σημεία δεδομένων — εκτός εάν εμφανιστεί διέγερση στις χαμηλές συγκεντρώσεις ως παράγοντας σύγχυσης. Συχνά, η ακρίβεια της εκτίμησης της EC_{20} είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη της EC_{10} , επειδή η EC_{20} βρίσκεται συνήθως στο σχεδόν ευθύγραμμο τμήμα της κεντρικής καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ερμηνεία της EC_{10} είναι δυνατόν να παρουσιάζει δυσκολίες, οφειλόμενες σε διέγερση της ανάπτυξης. Για τον λόγο αυτό, μολονότι η EC_{10} προκύπτει κατά κανόνα με επαρκή ακρίβεια, συνιστάται να αναφέρεται πάντα και η EC_{20} .

Συντελεστές στάθμισης

Επειδή η πειραματική διακύμανση δεν είναι γενικά σταθερή και, συνήθως, περιλαμβάνει μια αναλογική συνιστώσα, αποτελεί πλεονέκτημα η εφαρμογή σταθμισμένης παλινδρόμησης ως πάγια πρακτική. Για την ανάλυση αυτή, υποτίθεται, κατά κανόνα, ότι οι συντελεστές στάθμισης είναι αντιστρόφως ανάλογοι της διακύμανσης:

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

Πολλά προγράμματα παλινδρόμησης παρέχουν τη δυνατότητα ανάλυσης σταθμισμένης παλινδρόμησης, περιλαμβάνοντας πίνακα με συντελεστές στάθμισης. Εξυπηρετεί να κανονικοποιούνται οι συντελεστές στάθμισης, πολλαπλασιαζόμενοι επί $n/\Sigma w_i$ (όπου n ο αριθμός των σημείων δεδομένων), ώστε το άθροισμά τους να ισούται με τη μονάδα.

Κανονικοποίηση των αποκρίσεων

Η κανονικοποίηση με βάση τη μέση τιμή απόκρισης των μαρτύρων δημιουργεί ορισμένα προβλήματα αρχής και οδηγεί σε σχετικά περίπλοκη δομή της διακύμανσης. Η διαίρεση των αποκρίσεων δια του μέσου όρου των αποκρίσεων των μαρτύρων για να ληφθεί η εκατοστιαία αναστολή, εισάγει ένα πρόσθετο σφάλμα, οφειλόμενο στο σφάλμα του μέσου όρου των μαρτύρων. Εάν το σφάλμα αυτό δεν είναι αμελητέο, οι συντελεστές στάθμισης και τα όρια εμπιστοσύνης της παλινδρόμησης πρέπει να διορθωθούν, ώστε να ληφθεί υπόψη συνδιακύμανση με τον μάρτυρα (17). Σημειώτεον ότι η μεγάλη ακρίβεια στην εκτίμηση της μέσης τιμής της απόκρισης των μαρτύρων έχει σημασία για την ελαχιστοποίηση της συνολικής διακύμανσης της σχετικής απόκρισης. Η διακύμανση αυτή παρέχεται από τις ακόλουθες σχέσεις:

(Ο δείκτης i αναφέρεται στο επίπεδο συγκέντρωσης i και ο δείκτης 0 στους μάρτυρες.)

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

με διακύμανση:

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

Δεδομένου ότι ισχύει

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

με κανονική κατανομή των δεδομένων και με πλήθος προσδιορισμών m_i και m_0 :

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

η εξίσωση που παρέχει τη συνολική διακύμανση της σχετικής απόκρισης Y_i λαμβάνει τη μορφή:

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

Το σφάλμα του μέσου όρου των μαρτύρων είναι αντιστρόφως ανάλογο προς την τετραγωνική ρίζα του πλήθους των δοχείων μαρτύρων από το οποίο εξήχθη ο μέσος όρος. Ως εκ τούτου, μερικές φορές δικαιολογείται η προσθήκη ιστορικών δεδομένων, με την οποία περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό το σφάλμα. Μια εναλλακτική διαδικασία συνίσταται στη μη κανονικοποίηση των δεδομένων και στην προσαρμογή των απόλυτων τιμών απόκρισης, συμπεριλαμβανομένης της τιμής της απόκρισης του μάρτυρα, η οποία όμως εισάγεται ως πρόσθετη παράμετρος για προσαρμογή με μη γραμμική παλινδρόμηση. Με τη συνήθη διαπαραμετρική εξίσωση παλινδρόμησης, η μέθοδος αυτή απαιτεί την προσαρμογή τριών παραμέτρων και, συνεπώς, περισσότερα σημεία δεδομένων από τη μη γραμμική παλινδρόμηση σε δεδομένα που έχουν κανονικοποιηθεί με χρήση προκαθορισμένης απόκρισης μάρτυρα.

Αντίστροφα διαστήματα εμπιστοσύνης

Ο υπολογισμός διαστημάτων εμπιστοσύνης στη μη γραμμική παλινδρόμηση με αντίστροφη επίλυση είναι σχετικά πολύπλοκος και δεν διατίθεται ως βασική επιλογή στα συνήθη στατιστικά προγράμματα υπολογιστών. Κατά προσέγγιση όρια εμπιστοσύνης είναι δυνατόν να ληφθούν από τα τυποποιημένα προγράμματα μη γραμμικής παλινδρόμησης με αναπαραμετροποίηση (Bruce and Versteeg, 1992), η οποία περιλαμβάνει νέα γραφή της μαθηματικής εξίσωσης, με τις επιθυμητές εκτιμήσεις σημείων, π.χ. EC_{10} και EC_{50} , ως παραμέτρους προς υπολογισμό. (Έστω η εξίσωση $I = f(\alpha, \beta, \text{συγκέντρωση})$, στην οποία το $f(\alpha, \beta, \text{συγκέντρωση})$ αντικαθίσταται από την ισοδύναμη συνάρτηση $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{συγκέντρωση})$ με χρήση των σχέσεων ορισμού $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ και $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$.

Πιο άμεσος υπολογισμός (Andersen et al, 1998) εκτελείται με τη διατήρηση της αρχικής εξίσωσης και τη χρήση αναπτύγματος Taylor γύρω από τις μέσες τιμές των r_i και r_0 .

Πρόσφατα, διαδόθηκαν ευρέως οι μέθοδοι εύρεσης εκτιμητριών bootstrap. Στις μεθόδους αυτές, χρησιμοποιούνται τα δεδομένα από τις μετρήσεις και η συχνή νέα δειγματοληψία, η οποία κατευθύνεται από γεννήτρια τυχαίων αριθμών, για την εκτίμηση εμπειρικής κατανομής της διακύμανσης.

Βιβλιογραφία

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

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. 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.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

Γ.25. ΑΕΡΟΒΙΑ ΑΝΟΡΓΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ — ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 309 (2004) του ΟΟΣΑ (1)

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό της χρονικής πορείας της βιοαποικοδόμησης ελεγχόμενης ουσίας σε χαμηλή συγκέντρωση σε αερόβια φυσικά ύδατα και στην ποσοτικοποίηση των παρατηρήσεων υπό μορφή εκφράσεων κινητικής. Η προσομοιωτική αυτή δοκιμή είναι μια εργαστηριακή δοκιμή διαλείποντος έργου (ασυνεχής), με ανακινούμενες φιάλες, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταχύτητας της αερόβιας αποικοδόμησης οργανικών ουσιών σε δείγματα φυσικών επιφανειακών υδάτων (γλυκά, υφάλμυρα ή θαλάσσια). Βασίζεται στο πρότυπο ISO/DIS 14592-1 (2) και περιλαμβάνει επίσης στοιχεία από τις μεθόδους δοκιμής Γ.23 και Γ.24 (3)(4). Σε περίπτωση δοκιμής μεγάλης διάρκειας, η διαδικασία διαλείποντος έργου μπορεί να αντικατασταθεί από ημισυνεχή διαδικασία, ώστε να αποφευχθεί η αλλοίωση του μικροκόσμου της δοκιμής. Ο κύριος στόχος της προσομοιωτικής δοκιμής είναι ο προσδιορισμός της ανοργανοποίησης της ελεγχόμενης ουσίας στα επιφανειακά ύδατα, η δε ανοργανοποίηση χρησιμεύει ως βάση για την έκφραση της κινητικής της αποικοδόμησης. Η δοκιμή αυτή έχει ως στόχο και έναν δεύτερο, προαιρετικό στόχο, ο οποίος συνίσταται στην άντληση πληροφοριών σχετικά με την πρωταρχική αποικοδόμηση και τον σχηματισμό σημαντικών προϊόντων μετατροπής. Η ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής και, εφόσον είναι δυνατόν, ο ποσοτικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεών τους έχουν ιδιαίτερη σημασία για τις ουσίες πολύ βραδείας ανοργανοποίησης (π.χ. με χρόνο υποδιπλασιασμού του ολικού υπολειμματικού ^{14}C μεγαλύτερο των 60 ημερών). Λόγω αναλυτικών περιορισμών, για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των σημαντικών προϊόντων μετατροπής απαιτούνται συνήθως υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. > 100 μg/l).

Ως χαμηλή συγκέντρωση, στη συγκεκριμένη δοκιμή, νοείται μια συγκέντρωση αρκούντως χαμηλή (π.χ. μικρότερη από 1 μg/l έως 100 μg/l), ώστε να εξασφαλίζεται ότι η κινητική βιοαποικοδόμησης που θα προκύψει από τη δοκιμή θα αντικατοπτρίζει την κινητική που αναμένεται να παρατηρηθεί στο περιβάλλον. Σε σύγκριση με τη συνολική μάζα των βιοαποικοδομησίμων ανθρακούχων υποστρωμάτων που υπάρχουν στο χρησιμοποιούμενο για τη δοκιμή φυσικό νερό, η ελεγχόμενη ουσία σε χαμηλή συγκέντρωση θα χρησιμεύσει ως δευτερεύον υποστρώμα. Αυτό προϋποθέτει ότι η προβλεπόμενη κινητική βιοαποικοδόμησης είναι πρώτης τάξεως («μη αυξητική» κινητική) και ότι η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να αποικοδομηθεί με «συμμεταβολισμό». Η κινητική πρώτης τάξεως υποδηλώνει ότι η ταχύτητα αποικοδόμησης (mg/L/ημέρα) είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, η οποία ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου. Στις πραγματικές αντιδράσεις πρώτης τάξεως, η ειδική σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης, k , δεν εξαρτάται από τον χρόνο και τη συγκέντρωση. Η σταθερά k , δηλαδή, δεν παρουσιάζει σημαντική διακύμανση στη διάρκεια ενός πειράματος και δεν μεταβάλλεται με την αύξηση της συγκέντρωσης μεταξύ των πειραμάτων. Εξ ορισμού, η ειδική σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης ισούται προς τη σχετική μεταβολή της συγκέντρωσης ανά μονάδα χρόνου: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Αν και υπό τις οριζόμενες συνθήκες αναμένεται κανονικά κινητική πρώτης τάξεως, ενδέχεται να υπάρξουν περιστάσεις υπό τις οποίες είναι καταλληλότερη μια κινητική άλλης τάξεως. Παρεκκλίσεις από την κινητική πρώτης τάξεως μπορούν να παρατηρηθούν, επί παραδείγματι, σε περίπτωση που φαινόμενα μεταφοράς μάζας, όπως η ταχύτητα διάχυσης και όχι η ταχύτητα βιολογικής αντίδρασης, ελαττώνουν την ταχύτητα βιομετατροπής. Ωστόσο, σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, τα δεδομένα είναι δυνατόν να περιγραφούν με κινητική ψευδοπρώτης τάξεως με την παραδοχή σταθεράς ταχύτητας εξαρτώμενης από τη συγκέντρωση.

Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, είναι σκόπιμο να διατίθενται πληροφορίες σχετικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα της ελεγχόμενης ουσίας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (επί παραδείγματι, από συνήθεις δοκιμές διαλογής — screening tests), καθώς και στοιχεία για την αβιοτική αποικοδομησιμότητα, τα προϊόντα μετατροπής και τις σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τον προγραμματισμό του πειράματος και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η χρήση ελεγχόμενων ουσιών σημασμένων με ^{14}C και ο προσδιορισμός της κατανομής του ^{14}C μεταξύ των φάσεων στο τέλος της δοκιμής επιτρέπουν τον προσδιορισμό της τελικής βιοαποικοδόμησης. Σε περίπτωση χρησιμοποίησης μη σημασμένης ελεγχόμενης ουσίας, για να είναι δυνατή η εκτίμηση της τελικής βιοαποικοδόμησης πρέπει απαραίτητως να διεξαχθεί η δοκιμή με υψηλότερη συγκέντρωση και να είναι γνωστά όλα τα σημαντικά προϊόντα μετατροπής.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Πρωταρχική βιοαποικοδόμηση: Η μεταβολή της δομής (μετατροπή) χημικής ουσίας που προκαλείται από μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την απώλεια της χημικής ταυτότητάς της.

Λειτουργική βιοαποικοδόμηση: Η μεταβολή της δομής (μετατροπή) χημικής ουσίας που προκαλείται από μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την απώλεια συγκεκριμένης ιδιότητας.

Τελική αερόβια βιοαποικοδόμηση: Η διάσπαση χημικής ουσίας από μικροοργανισμούς, παρουσία οξυγόνου, προς διοξείδιο του άνθρακα, νερό και ανόργανα άλατα άλλων τυχόν συνυπαρχόντων στοιχείων (ανοργανοποίηση) και η παραγωγή νέας βιομάζας και οργανικών προϊόντων μικροβιακής βιοσύνθεσης.

Ανοργανοποίηση: Η διάσπαση χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης από μικροοργανισμούς, παρουσία οξυγόνου, προς διοξείδιο του άνθρακα, νερό και ανόργανα άλατα άλλων τυχόν συνυπαρχόντων στοιχείων.

Λανθάνουσα φάση: Ο χρόνος που μεσολαβεί από την έναρξη μιας δοκιμής έως ότου προσαρμοστεί ο διασπών μικροοργανισμός και αυξηθεί ο βαθμός βιοαποικοδόμησης χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης σε ανιχνεύσιμο επίπεδο (π.χ. 10 % της μέγιστης θεωρητικής βιοαποικοδόμησης ή μικρότερο ποσοστό, ανάλογα με την ακρίβεια της μεθόδου μέτρησης).

Μέγιστο επίπεδο βιοαποικοδόμησης: Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης σε μια δοκιμή, καταγραφόμενος σε ποσοστό επί τοις εκατό, άνω του οποίου δεν σημειώνεται περαιτέρω βιοαποικοδόμηση στη διάρκεια της δοκιμής.

Πρωταρχικό υπόστρωμα: Σύνολο φυσικών πηγών άνθρακα και ενέργειας που εξασφαλίζουν την ανάπτυξη και διατήρηση της μικροβιακής βιομάζας.

Δευτερεύον υπόστρωμα: Συστατικό υποστρώματος, του οποίου η συγκέντρωση είναι τόσο χαμηλή, ώστε η αποικοδόμησή του να εξασφαλίζει ασημαντες ποσότητες άνθρακα και ενέργειας για τους σχετικούς μικροοργανισμούς, σε σύγκριση με τον άνθρακα και την ενέργεια που εξασφαλίζονται μέσω της αποικοδόμησης των βασικών συστατικών του υποστρώματος (πρωτεύοντα υποστρώματα).

Σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης: Σταθερά ταχύτητας κινητικής πρώτης τάξεως ή ψευδοπρώτης τάξεως, k (d^{-1}), η οποία δηλώνει την ταχύτητα των διεργασιών αποικοδόμησης. Σε μια δοκιμή διαλείποντος έργου, η σταθερά k υπολογίζεται από το πρώτο τμήμα της καμπύλης αποικοδόμησης μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης.

Χρόνος υποδιπλασιασμού, $t_{1/2}$ (d): Όρος που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της ταχύτητας μιας αντίδρασης πρώτης τάξεως. Είναι ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί η συγκέντρωση στο ήμισυ. Η σχέση του χρόνου υποδιπλασιασμού με τη σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης παρίσταται από την εξίσωση $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Ημιπερίοδος αποικοδόμησης, DT_{50} (d): Όρος που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος των δοκιμών βιοαποικοδόμησης. Είναι ο χρόνος, συμπεριλαμβανομένης της λανθάνουσας φάσης, που απαιτείται για να επιτευχθεί βιοαποικοδόμηση κατά 50 %.

Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ): Το όριο ανίχνευσης (LOD) είναι η συγκέντρωση μιας ουσίας κάτω από την οποία δεν είναι δυνατόν να γίνει διάκριση της ταυτότητας της ουσίας από τις αναλυτικές τεχνικές ενδείξεις. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) είναι η συγκέντρωση μιας ουσίας κάτω από την δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης με αποδεκτή ακρίβεια.

Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC): Το μέρος του οργανικού άνθρακα σε ένα δείγμα νερού που δεν μπορεί να απομακρυνθεί με καθορισμένη τεχνική διαχωρισμού φάσεων, όπως επί παραδείγματι με φυγοκέντριση σε $40\ 000\ \text{ms}^{-2}$ επί 15 min ή με διήθηση μέσω μεμβρανών με πόρους διαμέτρου 0,2 μm -0,45 μm .

Συνολική ραδιενέργεια οργανικού ^{14}C (TOA): Η συνολική ραδιενέργεια ^{14}C που συσχετίζεται με οργανικό άνθρακα.

Ραδιενέργεια διαλελυμένου οργανικού ^{14}C (DOA): Η συνολική ραδιενέργεια ^{14}C που συσχετίζεται με διαλελυμένο οργανικό άνθρακα.

Ραδιενέργεια σωματιδιακού οργανικού ^{14}C (POA): Η συνολική ραδιενέργεια ^{14}C που συσχετίζεται με οργανικό άνθρακα σε σωματίδια.

1.3. ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η παρούσα προσομοιωτική δοκιμή εφαρμόζεται σε μη πτητικές ή ελαφρώς πτητικές οργανικές ουσίες που ελέγχονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Εφόσον χρησιμοποιούνται φιάλες που επικοινωνούν με τον ατμοσφαιρικό αέρα (π.χ. πωματισμένες με βύσμα υαλοβάμβακα), ουσίες με σταθερά του νόμου του Henry μικρότερη από $1\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ περίπου (της τάξεως των $10^{-5}\ \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) μπορούν να θεωρηθούν, στην πράξη, ως μη πτητικές. Χρησιμοποιώντας κλειστές φιάλες με διάκενο, είναι δυνατόν να ελεγχθούν ελαφρώς πτητικές ουσίες (με σταθερά του νόμου του Henry $< 100\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ή $< 10^{-3}\ \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$), χωρίς να υπάρξουν απώλειες από το σύστημα δοκιμής. Εάν δεν ληφθούν οι απαιτούμενες προφυλάξεις κατά την απομάκρυνση του CO_2 μπορεί να σημειωθεί απώλεια ουσιών σημασμένων με ^{14}C . Σε τέτοιου είδους καταστάσεις, ενδέχεται να χρειαστεί παγίδευση του CO_2 σε έναν εσωτερικό σύστημα απορρόφησης που περιέχει αλκάλι, ή χρησιμοποίηση εξωτερικού συστήματος απορρόφησης του CO_2 (άμεσος προσδιορισμός του $^{14}\text{CO}_2$, βλέπε παράρτημα 3). Για τον προσδιορισμό της κινητικής της βιοαποικοδόμησης, οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να είναι χαμηλότερες από τη διαλυτότητά της στο νερό. Αξίζει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι οι τιμές υδατοδιαλυτότητας που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ενδέχεται να είναι αρκετά υψηλότερες από τη διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας στο φυσικό νερό. Εναλλακτικά, η διαλυτότητα των ιδιαίτερα δυσδιάλυτων στο νερό ελεγχόμενων ουσιών μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας το φυσικό νερό της δοκιμής.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προσομοίωση της βιοαποικοδόμησης σε επιφανειακά ύδατα απαλλαγμένα αδρομερών σωματιδίων («πελαγική δοκιμή») ή σε θολερά επιφανειακά ύδατα τα οποία ενδέχεται να απαντούν, επί παραδείγματι, κοντά σε διεπαφή νερού/ιζημάτων («δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος»).

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή διεξάγεται με διαδικασία διαλείποντος έργου. Η ελεγχόμενη ουσία επωάζεται είτε μόνο σε επιφανειακά ύδατα («πελαγική δοκιμή») ή σε επιφανειακά ύδατα, στα οποία έχει προστεθεί εναιώρημα στερεών/ιζήματος σε συγκέντρωση από 0,01 έως 1 g/L ξηρού βάρους («δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος»), με σκοπό την προσομοίωση υδάτινου όγκου με αιωρούμενα στερεά ή ιζήματα σε επαναιώρηση. Η συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών/ιζήματων στα περισσότερα επιφανειακά ύδατα αντιστοιχεί στο κατώτερο άκρο της ανωτέρω περιοχής τιμών. Οι δοκιμαστικές φιάλες επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό αερόβιες συνθήκες και ανακίνηση. Για τον προσδιορισμό της κινητικής της αποικοδόμησης πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο τουλάχιστον διαφορετικές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, η καθεμία από τις οποίες θα είναι πενταπλάσια έως δεκαπλάσια της προηγούμενης. Οι συγκεντρώσεις αυτές πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές του εύρους των αναμενόμενων συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας στο περιβάλλον. Η μέγιστη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 μg/L, προτιμώνται ωστόσο μέγιστες συγκεντρώσεις δοκιμής κάτω των 10 μg/L ή μικρότερες, ώστε να εξασφαλίζεται ότι η κινητική της βιοαποικοδόμησης είναι πρώτης τάξεως. Η χαμηλότερη συγκέντρωση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 μg/L, αλλά είναι προτιμότερο οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις να είναι της τάξεως των 1-2 μg/L ή μικρότερες από 1 μg/L. Κατά κανόνα, επαρκής ανάλυση τόσο χαμηλών συγκεντρώσεων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση διαθέσιμων στο εμπόριο ουσιών σημασμένων με ^{14}C . Λόγω αναλυτικών περιορισμών, είναι συχνά αδύνατο να μετρηθεί η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας με την απαιτούμενη ακρίβεια, όταν η ουσία αυτή χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση ≤ 100 μg/L (βλέπε παράγραφο 1.7.2 δεύτερο εδάφιο). Για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό σημαντικών προϊόντων μετατροπής ή σε περίπτωση που δεν διατίθεται ειδική αναλυτική μέθοδος με χαμηλό όριο ανίχνευσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας (> 100 μg/L και ορισμένες φορές > 1 mg/L). Όταν όμως η δοκιμή διεξάγεται με υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, τα αποτελέσματα ενδέχεται να μη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της σταθεράς αποικοδόμησης πρώτης τάξεως και του χρόνου υποδιπλασιασμού, δεδομένου ότι, πιθανότατα, η κινητική της αποικοδόμησης δεν θα είναι πρώτης τάξεως.

Η αποικοδόμηση παρακολουθείται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα με μέτρηση είτε του υπολειμματικού άνθρακα ^{14}C ή της υπολειμματικής συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας, όταν εφαρμόζεται ειδική μέθοδος χημικής ανάλυσης. Η σήμανση με ^{14}C του σταθερότερου τμήματος του μορίου επιτρέπει τον προσδιορισμό της συνολικής ανοργανοποίησης, ενώ η σήμανση με ^{14}C ενός λιγότερο σταθερού τμήματος του μορίου, καθώς και η εφαρμογή ειδικής αναλυτικής μεθόδου, επιτρέπουν την εκτίμηση μόνο της πρωταρχικής βιοαποικοδόμησης. Το σταθερότερο τμήμα του μορίου, ωστόσο, δεν περιλαμβάνει αναγκαστικά τη σημαντική λειτουργική ομάδα του (η οποία μπορεί να συνδέεται με μία ειδική ιδιότητα, όπως η τοξικότητα, η βιοσυσώρευση, κλπ.). Στην περίπτωση αυτή, είναι ενδεχομένως σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί ελεγχόμενη ουσία σημασμένη με ^{14}C στη λειτουργική ομάδα, ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση της εξάλειψης της συγκεκριμένης ιδιότητας.

1.5. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Στην παρούσα δοκιμή μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο ραδιοσημασμένες, όσο και μη σημασμένες ελεγχόμενες ουσίες. Συνιστάται η σήμανση με ^{14}C , κατά κανόνα του ή των σταθερότερων τμημάτων του μορίου (βλέπε επίσης παράγραφο 1.4). Για τις ουσίες που περιέχουν περισσότερους του ενός αρωματικούς δακτυλίους, είναι προτιμότερο να σημαίνονται με ^{14}C ένα ή περισσότερα άτομα άνθρακα σε κάθε δακτύλιο. Επιπλέον, πρέπει κατά προτίμηση να σημαίνονται με ^{14}C ένα ή περισσότερα άτομα άνθρακα και στις δύο πλευρές των ευκόλως αποικοδομήσιμων δεσμών. Η χημική ή/και ραδιοχημική καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας απαιτείται να είναι $> 95\%$. Για τις ραδιοσημασμένες ουσίες, προκειμένου να διευκολυνθεί η μέτρηση του ^{14}C σε δοκιμές που διεξάγονται με χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις, προτιμάται η ειδική ραδιενέργεια να είναι της τάξεως των 50 μCi/mg (1,85 MBq) ή μεγαλύτερη. Πρέπει να διατίθενται οι ακόλουθες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία:

- διαλυτότητα στο νερό [μέθοδος Α.6],
- διαλυτότητα σε οργανικό(ούς) διαλύτη(ες) (ουσίες χρησιμοποιούμενες με διαλύτη ή δυσδιάλυτες στο νερό),
- σταθερά διαστάσεως (pKa), εφόσον η ουσία ελευθερώνει ή προσλαμβάνει πρωτόνια [κατευθυντήρια γραμμή TG 112 του ΟΟΣΑ] (5),
- τάση ατμών [μέθοδος Α.4] και σταθερά του νόμου του Henry,
- χημική σταθερότητα στο νερό και στο σκοτάδι (υδρόλυση) [μέθοδος Γ.7].

Όταν διεξάγονται δοκιμές δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών σε θαλασσινό νερό, μπορεί να είναι χρήσιμο να είναι γνωστή η σταθερά εξάλυσης (ή «σταθερά Setschenow») K^s , η οποία ορίζεται ως εξής: $\log(S/S') = K^s C_m$, όπου S και S' είναι η διαλυτότητα της ουσίας σε γλυκό νερό και θαλασσινό νερό, αντιστοίχως, ενώ C_m είναι η μοριακή συγκέντρωση του άλατος.

Εάν διεξάγεται «δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος», θα πρέπει να διατίθενται επιπλέον οι ακόλουθες πληροφορίες:

- συντελεστής κατανομής σε μίγμα n-οκτανόλης/νερού [μέθοδος Α.8],
- συντελεστής προσρόφησης [μέθοδος Γ.18].

Άλλες χρήσιμες πληροφορίες είναι οι εξής:

- συγκέντρωση στο περιβάλλον, εφόσον είναι γνωστή ή έχει εκτιμηθεί,
- τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας για τους μικροοργανισμούς [μέθοδος Γ.11],
- άμεση ή/και εγγενής βιοαποικοδομησιμότητα [μέθοδοι Γ.4 Α-ΣΤ, Γ.12, Γ.9, κατευθυντήρια γραμμή TG 302 του ΟΟΣΑ (5)],
- αερόβια ή αναερόβια βιοαποικοδομησιμότητα στο έδαφος και μελέτες μετατροπής στη διεπαφή ιζήματος/νερού [μέθοδοι Γ.23, Γ.24].

1.6. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως ουσία αναφοράς μία ουσία η οποία κατά κανόνα αποικοδομείται εύκολα υπό αερόβιες συνθήκες (π.χ. ανιλίνη ή βενζοϊκό νάτριο). Ο αναμενόμενος χρόνος αποικοδόμησης της ανιλίνης και του βενζοϊκού νατρίου είναι συνήθως μικρότερος από 2 εβδομάδες. Η ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται με σκοπό να εξασφαλιστεί ότι η μικροβιακή δραστηριότητα του νερού δοκιμής περικλείεται εντός ορισμένων ορίων, δηλαδή ότι το νερό περιέχει ενεργή μικροβιακή χλωρίδα.

1.7. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

1.7.1. Ανάκτηση

Αμέσως μετά την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας, κάθε αρχική συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να επαληθεύεται με μέτρηση της ραδιενέργειας του ^{14}C , η με χημική ανάλυση εφόσον πρόκειται για μη σημασμένη ουσία, τουλάχιστον σε διπλά δείγματα. Με τον τρόπο αυτό συγκεντρώνονται πληροφορίες για τη δυνατότητα εφαρμογής και την επαναληψτικότητα της αναλυτικής μεθόδου, καθώς και για την ομοιογενή κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας. Κατά κανόνα, στη μετέπειτα ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιείται η μετρούμενη αρχική ραδιενέργεια του ^{14}C ή η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και όχι η ονομαστική συγκέντρωση, καθώς με τον τρόπο αυτό αντισταθμίζονται οι απώλειες λόγω ρόφησης και τα σφάλματα δόσολογίας. Για τις σημασμένες με ^{14}C ελεγχόμενες ουσίες, ο βαθμός ανάκτησης στο τέλος του πειράματος προκύπτει από το ισοζύγιο μάζας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.4 τελευταίο εδάφιο). Στην ιδανική περίπτωση, το ισοζύγιο της ραδιοσημασμένης μάζας πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90 % και 110 % ενώ, για τις μη σημασμένες ελεγχόμενες ουσίες, η αναλυτική ακρίβεια θα πρέπει να συνεπάγεται αρχική ανάκτηση μεταξύ 70 % και 110 %. Τα εν λόγω πεδία τιμών πρέπει να ερμηνεύονται ως στόχοι και να μην χρησιμοποιούνται ως κριτήρια αποδοχής της δοκιμής. Εναλλακτικά, μπορεί να προσδιορίζεται η αναλυτική ακρίβεια για την ελεγχόμενη ουσία σε συγκέντρωση μικρότερη από την αρχική, καθώς και για τα σημαντικά προϊόντα μετατροπής.

1.7.2. Επαναληψτικότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου

Η επαναληψτικότητα της αναλυτικής μεθόδου (συμπεριλαμβανομένης της αποδοτικότητας της αρχικής συλλογής), όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας, καθώς και των προϊόντων μετατροπής, κατά περίπτωση, θα πρέπει να ελέγχεται με πενταπλή ανάλυση των επιμέρους δειγμάτων των επιφανειακών υδάτων.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) της αναλυτικής μεθόδου για την ελεγχόμενη ουσία και για τα προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % της αρχικής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα δοκιμής, εφόσον αυτό είναι δυνατόν. Το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) θα πρέπει να είναι ίσο ή μικρότερο από 10 % της χρησιμοποιηθείσας συγκέντρωσης. Οι χημικές αναλύσεις πολλών οργανικών ουσιών και των προϊόντων μετατροπής τους απαιτούν συχνά η ελεγχόμενη ουσία να χρησιμοποιείται σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση, δηλαδή > 100 μg/L.

1.8. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.8.1. Εξοπλισμός

Για την εκτέλεση της δοκιμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν κωνικές ή κυλινδρικές φιάλες κατάλληλης χωρητικότητας (π.χ. 0,5 ή 1 λίτρου), πωματισμένες με πώματα από σιλικόνη ή καουτσούκ, ή φιάλες ορού με αδιαπέραστα από το CO_2 καλύμματα (π.χ. με διαφράγματα από βουτυλοκαουτσούκ). Μία άλλη δυνατότητα είναι να χρησιμοποιηθούν πολλές φιάλες και να λαμβάνεται ως δείγμα ολόκληρο το περιεχόμενο μιας φιάλης, τουλάχιστον εις διπλούν, σε κάθε χρονικό διάστημα δειγματοληψίας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 τελευταίο εδάφιο). Για μη πτητικές μη ραδιοσημασμένες ελεγχόμενες ουσίες, δεν απαιτούνται αεροστεγή πώματα ή καλύμματα· μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαλαρά βύσματα βάμβακα που εμποδίζουν τη μόλυνση από τον αέρα (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 δεύτερο εδάφιο). Οι ελαφρά πτητικές ουσίες πρέπει να ελέγχονται σε σύστημα βιομετρικού τύπου με ήπια ανάδευση της επιφάνειας του νερού. Προκειμένου να αποκλειστεί κάθε

ενδεχόμενο βακτηριακής μόλυνσης, τα δοχεία μπορούν να αποστειρωθούν με θέρμανση ή σε αυτόκλειστο πριν από τη χρήση τους. Χρησιμοποιείται επίσης ο ακόλουθος συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός:

- συσκευή ανατάραξης ή μαγνητικοί αναδευτήρες για συνεχή ανακίνηση των δοκιμαστικών φιαλών,
- φυγόκεντρος,
- πεχάμετρο,
- θολοσίμετρο για νεφελομετρικές μετρήσεις της θολερότητας,
- πυριατήριο ή φούρνος μικροκυμάτων για προσδιορισμούς ξηρού βάρους,
- συσκευή διήθησης με μεμβράνη,
- αυτόκλειστο ή κλίβανος για την αποστείρωση των γυάλινων σκευών,
- εγκαταστάσεις για τον χειρισμό σημασμένων με ^{14}C ουσιών,
- εξοπλισμός για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ραδιενέργειας του ^{14}C σε δείγματα διαλυμάτων που παγιδεύουν το CO_2 και, εφόσον απαιτείται, σε δείγματα ιζημάτων,
- αναλυτικός εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας (και της ουσίας αναφοράς), σε περίπτωση ειδικής χημικής ανάλυσης (π.χ. αέριος χρωματογράφος, υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης).

1.8.2. Μητρικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας

Για την παρασκευή των μητρικών διαλυμάτων της ελεγχόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό (βλέπε παράγραφο 1.8.7 πρώτο εδάφιο). Το απιονισμένο νερό δεν πρέπει να περιέχει ουσίες ενδεχομένως τοξικές για τους μικροοργανισμούς, ενώ η περιεκτικότητά του σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 mg/L (6).

1.8.3. Συλλογή και μεταφορά των επιφανειακών υδάτων

Ο χώρος της δειγματοληψίας από τα επιφανειακά ύδατα πρέπει να επιλέγεται ανάλογα με το σκοπό της δοκιμής στην εκάστοτε περίπτωση. Κατά την επιλογή των χώρων δειγματοληψίας, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το πιθανό ιστορικό γεωργικών, βιομηχανικών ή αστικών εισροών. Υδάτινο περιβάλλον για το οποίο είναι γνωστό ότι έχει ρυπανθεί από την ελεγχόμενη ουσία ή από ουσίες ανάλογης δομής κατά την προηγούμενη τετραετία, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συλλογή νερού δοκιμής, εκτός εάν ρητός σκοπός του αναλυτή είναι να διερευνήσει την ταχύτητα αποικοδόμησης σε χώρους εκτεθέντες στο παρελθόν στην ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να μετράται το pH και η θερμοκρασία του νερού στον χώρο δειγματοληψίας. Επίσης, πρέπει να σημειώνεται το βάθος από το οποίο συλλέγεται το δείγμα, καθώς και η όψη του δείγματος του νερού (π.χ. χρώμα και θολερότητα) (βλέπε παράγραφο 3). Απαιτείται μέτρηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου ή/και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού στο νερό και στην επιφανειακή στιβάδα του ιζήματος, προκειμένου να αποδειχθεί ότι επικρατούν αερόβιες συνθήκες, εκτός εάν αυτό προκύπτει σαφώς από την εμφάνιση και το ιστορικό του χώρου δειγματοληψίας. Τα επιφανειακά ύδατα πρέπει να μεταφέρονται σε απόλυτα καθαρό δοχείο. Η θερμοκρασία του δείγματος κατά τη διάρκεια της μεταφοράς δεν πρέπει να υπερβαίνει σημαντικά τη θερμοκρασία στην οποία εκτελείται η δοκιμή. Εάν η μεταφορά διαρκεί περισσότερο από 2 έως 3 ώρες, συνιστάται ψύξη στους 4 °C. Το δείγμα νερού δεν πρέπει να καταψύχεται.

1.8.4. Αποθήκευση και προετοιμασία των επιφανειακών υδάτων

Η δοκιμή θα πρέπει να αρχίζει κατά προτίμηση εντός εικοσιτετράωρου από τη δειγματοληψία. Ο χρόνος αποθήκευσης του νερού, εφόσον αυτή είναι αναγκαία, πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο και να μην υπερβαίνει σε καμία περίπτωση, τις 4 εβδομάδες. Το δείγμα του νερού πρέπει να φυλάσσεται στους 4 °C και να αερίζεται έως ότου χρησιμοποιηθεί. Πριν από τη χρήση του δείγματος, πρέπει να απομακρύνονται τα αδρομερή σωματίδια, επί παραδείγματι με διήθηση μέσω ηθμού νάιλον με βροχιδές διαμέτρου 100 μm περίπου ή μέσω αδρού χάρτινου ηθμού ή με καθίζηση.

1.8.5. Παρασκευή του τροποποιημένου με ίζημα νερού (προαιρετικό)

Για τη δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, προστίθεται επιφανειακό ίζημα στις φιάλες που περιέχουν φυσικό νερό (από το οποίο έχουν απομακρυνθεί με διήθηση τα αδρομερή σωματίδια, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.8.4), ώστε να σχηματιστεί εναιώρημα. Η συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,01 και 1 g/L. Το επιφανειακό ίζημα πρέπει να προέρχεται από το χώρο από τον οποίο ελήφθη το δείγμα νερού. Ανάλογα με το συγκεκριμένο υδάτινο περιβάλλον, το επιφανειακό ίζημα μπορεί να χαρακτηρίζεται είτε από υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (2,5-7,5 %) και λεπτή υφή είτε από χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (0,5-2,5 %) και αδρή υφή (3). Το επιφανειακό ίζημα παρασκευάζεται ως εξής: με τη βοήθεια διαφανούς πλαστικού σωλήνα εξάγονται πολλά καρότα από το

ιζήμα, αποκόβονται τα ανώτερα αερόβια στρώματα (από την επιφάνεια μέχρι βάθους 5 mm κατ' ανώτατο όριο) αμέσως μετά τη δειγματοληψία και συνενώνονται. Το προκύπτον δείγμα ιζήματος μεταφέρεται σε δοχείο με μεγάλο διάκενο, ώστε το ιζήμα να διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες (εάν η μεταφορά διαρκεί περισσότερο από 2-3 ώρες, το δείγμα ψύχεται στους 4 °C). Παρασκευάζεται εναιώρημα του δείγματος ιζήματος στο νερό της δοκιμής σε αναλογία 1:10 και φυλάσσεται αεριζόμενο στους 4 °C μέχρι τη χρήση του. Ο χρόνος αποθήκευσης του ιζήματος, εφόσον αυτή είναι αναγκαία, πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο και να μην υπερβαίνει σε καμία περίπτωση, τις 4 εβδομάδες.

1.8.6. Ημισυνεχής διαδικασία (προαιρετική)

Σε περίπτωση που η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, έως ότου καταστεί δυνατή η μέτρηση σημαντικής αποικοδόμησης της ελεγχόμενης ουσίας, είναι μεγάλη, μπορεί να χρειαστεί παρατεταμένη επώαση (επί πολλούς μήνες). Εάν αυτό είναι γνωστό από προηγούμενες δοκιμές με την εν λόγω ουσία, η δοκιμή μπορεί να αρχίσει με μία ημισυνεχή διαδικασία, η οποία παρέχει τη δυνατότητα περιοδικής ανανέωσης μέρους του νερού ή του εναιωρήματος (βλέπε παράρτημα 2). Εναλλακτικά, η κανονική δοκιμή διαλείποντος έργου μπορεί να μετατραπεί σε ημισυνεχή δοκιμή, εφόσον δεν έχει παρατηρηθεί αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας μετά την πάροδο 60 περίπου ημερών από την έναρξη της διαδικασίας διαλείποντος έργου (βλέπε παράγραφο 1.8.8.3 δεύτερο εδάφιο).

1.8.7. Προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας (ή της ουσίας αναφοράς)

Για τις ευδιάλυτες στο νερό ουσίες (> 1 mg/L) χαμηλής πτητικότητας (σταθερά του νόμου του Henry < 1 Pa·m³/mol ή < 10⁻⁵ atm·m³/mol), μπορεί να παρασκευαστεί μητρικό διάλυμα σε αποιονισμένο νερό (βλέπε παράγραφο 1.8.2). Προστίθεται ο κατάλληλος όγκος μητρικού διαλύματος στα δοκιμαστικά δοχεία, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση. Ο όγκος του τυχόν προστιθέμενου μητρικού διαλύματος πρέπει να περιορίζεται στον ελάχιστο πρακτικά εφικτό (< 10 % του όγκου του τελικού υγρού, εφόσον είναι δυνατόν). Μία άλλη διαδικασία συνίσταται στη διάλυση της ελεγχόμενης ουσίας σε μεγαλύτερο όγκο νερού δοκιμής, αντί της χρήσης οργανικών διαλυτών.

Εφόσον δεν υπάρχει άλλη λύση, για την παρασκευή των μητρικών διαλυμάτων μη πτητικών δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών χρησιμοποιείται πτητικός οργανικός διαλύτης. Ωστόσο, η ποσότητα του προστιθέμενου στο σύστημα δοκιμής διαλύτη δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 % v/v ούτε να έχει δυσμενή επίδραση στη μικροβιακή δραστηριότητα. Ο διαλύτης δεν πρέπει να επηρεάζει τη σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας στο νερό. Θα πρέπει να απομακρύνεται μέχρι να παραμείνει μία ελάχιστη ποσότητα, ώστε να μην αυξάνει σημαντικά τη συγκέντρωση DOC στο νερό ή στο εναιώρημα δοκιμής. Αυτό ελέγχεται με ειδική για τη συγκεκριμένη ουσία ανάλυση ή, εφόσον είναι δυνατόν, με ανάλυση του DOC (6). Λαμβάνεται μέριμνα ώστε η ποσότητα του μεταφερόμενου διαλύτη να περιορίζεται στην απολύτως αναγκαία και να εξασφαλίζεται ότι η ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας μπορεί να διαλυθεί στον τελικό όγκο του νερού της δοκιμής. Για την εισαγωγή της ελεγχόμενης ουσίας στα δοκιμαστικά δοχεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες τεχνικές, όπως περιγράφεται στην αναφερόμενη υπό (7) και (8) βιβλιογραφία. Όταν η ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιείται με φορέα οργανικό διαλύτη, οι μάρτυρες για το διαλύτη, που περιέχουν το νερό δοκιμής (χωρίς καμία προσθήκη) και το νερό της δοκιμής στο οποίο έχει προστεθεί ουσία αναφοράς, πρέπει να υποβάλλονται στην ίδια αγωγή όπως τα ενεργά δοκιμαστικά δοχεία που περιέχουν την ελεγχόμενη ουσία σε φορέα διαλύτη. Οι μάρτυρες για το διαλύτη χρησιμοποιούνται με σκοπό να εξεταστούν οι τυχόν δυσμενείς επιδράσεις του διαλύτη στη μικροβιακή χλωρίδα, όπως προκύπτουν από την αποικοδόμηση της ουσίας αναφοράς.

1.8.8. Συνθήκες δοκιμής

1.8.8.1. Θερμοκρασία δοκιμής

Η επώαση πρέπει να λαμβάνει χώρα στο σκοτάδι (κατά προτίμηση) ή σε διάχυτο φως σε ελεγχόμενη (± 2 °C) θερμοκρασία, η οποία μπορεί να είναι η επιτόπια θερμοκρασία ή μία πρότυπη θερμοκρασία 20-25 °C. Η επιτόπια θερμοκρασία αντιστοιχεί είτε στην πραγματική θερμοκρασία του δείγματος τη στιγμή της δειγματοληψίας ή στη μέση επιτόπια θερμοκρασία στο χώρο δειγματοληψίας.

1.8.8.2. Ανακίνηση

Απαιτείται συνεχής ανατάραξη ή ανάδευση, ώστε τα σωματίδια και οι μικροοργανισμοί να διατηρούνται σε εναιώρημα. Η ανακίνηση διευκολύνει επίσης τη μεταφορά οξυγόνου από το διάκενο στο υγρό, ούτως ώστε να επικρατούν συνεχώς αερόβιες συνθήκες. Οι φιάλες τοποθετούνται σε συσκευή ανατάραξης (περίπου στις 100 rpm) ή σε μαγνητικό ανάδευτήρα. Η ανακίνηση πρέπει να είναι συνεχής. Ωστόσο, η ανατάραξη ή η ανάδευση πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο ήπια, αλλά να διατηρεί συνεχώς την ομοιογένεια του εναιωρήματος.

1.8.8.3. Διάρκεια της δοκιμής

Κατά κανόνα, η διάρκεια της δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 60 ημέρες, εκτός εάν εφαρμόζεται η ημισυνεχής διαδικασία με περιοδική ανανέωση του εναιωρήματος (βλέπε παράγραφο 1.8.6 και παράρτημα 2). Στη διαδικασία διαλείποντος έργου, ωστόσο, ο χρόνος της δοκιμής μπορεί να παραταθεί σε 90 ημέρες κατ' ανώτατο όριο, εφόσον η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας έχει αρχίσει εντός των πρώτων 60 ημερών. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα με προσδιορισμό της υπολειμματικής ραδιενέργειας του ^{14}C ή του εκλυόμενου $^{14}\text{CO}_2$ (βλέπε παράγραφο 1.8.9.4) ή/και με χημική ανάλυση (παράγραφος 1.8.9.5). Η διάρκεια της επώασης πρέπει να επαρκεί για την αξιολόγηση της διαδικασίας αποικοδόμησης. Κατά προτίμηση, ο βαθμός αποικοδόμησης πρέπει να υπερβαίνει το 50 %. Για τις βραδέως αποικοδομούμενες ουσίες, ο βαθμός αυτός πρέπει να είναι αρκούντως υψηλός (συνήθως μεγαλύτερος από 20 %), ώστε να μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης.

Απαιτούνται περιοδικές μετρήσεις του pH και της συγκέντρωσης οξυγόνου στο σύστημα δοκιμής, εκτός εάν αυτές καθίστανται περιττές λόγω της κτηθείσας πείρας από ανάλογες δοκιμές με δείγματα νερού και ιζημάτων που συλλέχθηκαν στον ίδιο χώρο δειγματοληψίας. Υπό ορισμένες συνθήκες, ο μεταβολισμός πρωτευνώντων υποστρωμάτων που απαντούν σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις στο νερό ή στο ίζημα ενδέχεται να προκαλέσει έκλυση CO_2 και μείωση του οξυγόνου σε βαθμό που να μεταβάλλονται σημαντικά οι πειραματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

1.8.9. Διαδικασία

1.8.9.1. Προετοιμασία των φιαλών για την πελαγική δοκιμή

Κατάλληλος όγκος νερού δοκιμής (όχι μικρότερος από 100 ml περίπου) μεταφέρεται στις δοκιμαστικές φιάλες ώστε αυτές να πληρούνται κατά το ένα τρίτο περίπου. Εάν χρησιμοποιούνται πολλαπλές φιάλες (ώστε να λαμβάνεται ως δείγμα ολόκληρο το περιεχόμενο μιας φιάλης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας), ο κατάλληλος όγκος νερού δοκιμής είναι επίσης 100 ml περίπου, δεδομένου ότι μικροί όγκοι δειγμάτων ενδέχεται να επηρεάσουν τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης. Προστίθεται η ελεγχόμενη ουσία, η οποία λαμβάνεται από μητρικό διάλυμα, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 1.8.2 και 1.8.7. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, η μία πενταπλάσια έως δεκαπλάσια της άλλης, για τον προσδιορισμό της κινητικής της αποικοδόμησης και τον υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας αποικοδόμησης. Και οι δύο συγκεντρώσεις που επιλέγονται πρέπει να είναι χαμηλότερες των 100 $\mu\text{g/L}$ και να κυμαίνονται, κατά προτίμηση, στην περιοχή $< 1-10 \mu\text{g/L}$.

Οι φιάλες πωματίζονται με πώματα ή καλύμματα αδιαπέραστα από τον ατμοσφαιρικό αέρα και το CO_2 . Οι φιάλες που περιέχουν μη σημασμένες με ^{14}C μη πηκτικές ελεγχόμενες ουσίες, μπορούν να πωματίζονται με χαλαρά βύσματα από υαλοβάμβακα που εμποδίζουν τη μόλυνση από τον ατμοσφαιρικό αέρα (βλέπε παράγραφο 1.8.1), υπό τον όρο ότι είναι γνωστή η μη πηκτικότητα τυχόν σημαντικών προϊόντων αποικοδόμησης και ότι εκτελείται έμμεσος προσδιορισμός του CO_2 (βλέπε παράρτημα 3).

Οι φιάλες επωάζονται στη θερμοκρασία που έχει επιλεγεί (βλέπε παράγραφο 1.8.8.1). Λαμβάνονται δείγματα για χημική ανάλυση ή για μετρήσεις του ^{14}C κατά την έναρξη της δοκιμής (δηλαδή πριν αρχίσει η βιοαποικοδόμηση - βλέπε παράγραφο 1.7.1) και σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα κατά την πορεία της δοκιμής. Η δειγματοληψία μπορεί να συνίσταται στη λήψη επιμέρους δειγμάτων (π.χ. ποσοτήτων 5 ml) από καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες ή στη λήψη ολόκληρου του περιεχομένου μιας φιάλης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Η ανοργανοποίηση της ελεγχόμενης ουσίας προσδιορίζεται είτε έμμεσα είτε άμεσα (βλέπε παράρτημα 3). Για τον υπολογισμό αξιόπιστης σταθεράς ταχύτητας απαιτούνται συνήθως τουλάχιστον πέντε σημεία δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια της φάσης αποικοδόμησης (δηλαδή μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης), εκτός εάν είναι δυνατόν να τεκμηριωθεί ότι για τις ταχέως αποικοδομήσιμες ουσίες αρκούν τρία σημεία δειγματοληψίας. Για βραδέως αποικοδομούμενες ουσίες, μπορούν να διενεργηθούν άνευτα περισσότερα σημεία δεδομένων για τον υπολογισμό της σταθεράς k. Δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί πάγιο χρονοδιάγραμμα για τη δειγματοληψία, δεδομένου ότι η ταχύτητα βιοαποικοδόμησης ποικίλλει. Ωστόσο, σε περίπτωση βραδείας αποικοδόμησης, συνιστάται μία δειγματοληψία εβδομαδιαίως. Εάν η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας είναι ταχεία, θα πρέπει να διενεργείται μία δειγματοληψία ημερησίως κατά τις τρεις πρώτες ημέρες και, στη συνέχεια, μία ανά δύο ή τρεις ημέρες. Υπό ορισμένες περιστάσεις, όταν επί παραδείγματι η ουσία υδρολύεται ταχύτατα, ενδέχεται να χρειαστεί ωριαία δειγματοληψία. Συνιστάται η διεξαγωγή προκαταρκτικής μελέτης πριν από τη δοκιμή, προκειμένου να προσδιοριστούν τα ενδεδειγμένα διαστήματα δειγματοληψίας. Εάν πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα δείγματα για περαιτέρω ειδική ανάλυση, είναι σκόπιμο να λαμβάνονται περισσότερα δείγματα και, στη συνέχεια, να επιλέγονται εκείνα που θα αναλυθούν στο τέλος του πειράματος, ακολουθώντας μία στρατηγική της αντίστροφης σειράς, δηλαδή τα τελευταία δείγματα αναλύονται πρώτα (οδηγίες σχετικά με τη σταθερότητα των δειγμάτων κατά την αποθήκευση παρέχονται στην παράγραφο 1.8.9.5 δεύτερο εδάφιο).

1.8.9.2. Αριθμός φιαλών και δειγμάτων

Ετοιμάζεται επαρκής αριθμός δοκιμαστικών φιαλών ως εξής:

- δοκιμαστικές φιάλες: διπλές τουλάχιστον φιάλες για κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας (κατά προτίμηση, τουλάχιστον 3) ή μία σειρά δοκιμαστικών φιαλών για κάθε συγκέντρωση, σε περίπτωση που συλλέγεται ολόκληρο το περιεχόμενο των φιαλών σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας (συμβολίζονται ως F_T),
- δοκιμαστικές φιάλες για τον υπολογισμό του ισοζυγίου της μάζας: διπλές τουλάχιστον φιάλες για κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση (συμβολίζονται ως F_M),

- τυφλός μάρτυρας, χωρίς ελεγχόμενη ουσία· τουλάχιστον μία φιάλη για την τυφλή δοκιμή, η οποία περιέχει μόνο το νερό δοκιμής (συμβολίζεται ως F_B),
- μάρτυρας αναφοράς· διπλές φιάλες που περιέχουν την ουσία αναφοράς (π.χ. ανιλίνη ή βενζοϊκό νάτριο, σε συγκέντρωση 10 μg/l) (συμβολίζονται ως F_C). Ο μάρτυρας αναφοράς χρησιμοποιείται για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ελάχιστης μικροβιακής δραστηριότητας. Εφόσον εξυπηρετεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ραδιοσημασμένη ουσία αναφοράς. Αυτό ισχύει και στην περίπτωση που η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας παρακολουθείται με χημικές αναλύσεις,
- στείρος μάρτυρας· μία ή δύο φιάλες που περιέχουν αποστειρωμένο νερό δοκιμής για την εξέταση τυχόν αβιοτικής αποικοδόμησης ή άλλης μη βιολογικής εξάλειψης της ελεγχόμενης ουσίας (συμβολίζονται ως F_S). Η παύση της βιολογικής δραστηριότητας μπορεί να επιτευχθεί με τη θέρμανση του νερού δοκιμής σε αυτόκλειστο (121 °C, 20 λεπτά) ή με την προσθήκη τοξικού παράγοντα (π.χ. νατραζίδιο (NaN₃), 10-20 g/l, χλωριούχος υδράργυρος (HgCl₂), 100 mg/l, ή φορμαλδεύδη, 100 mg/l) ή με ακτινοβόληση με ακτίνες γ. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται HgCl₂, μετά τη χρήση του θα πρέπει να αντιμετωπίζεται ως τοξικό απόβλητο. Η αποστείρωση νερού στο οποίο έχουν προστεθεί μεγάλες ποσότητες ιζήματος δεν είναι εύκολη και γι' αυτό συνιστάται επανειλημμένη θέρμανση σε αυτόκλειστο (π.χ. τρεις φορές). Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η αποστείρωση σε αυτόκλειστο μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση των σχετικών με τη ρόφηση χαρακτηριστικών του ιζήματος,
- μάρτυρες για το διαλύτη, που περιέχουν νερό δοκιμής και νερό δοκιμής στο οποίο έχει προστεθεί ουσία αναφοράς· διπλές φιάλες που περιέχουν την ίδια ποσότητα διαλύτη και υποβάλλονται στην ίδια διαδικασία με εκείνη που εφαρμόστηκε για την ελεγχόμενη ουσία. Σκοπός των μαρτύρων αυτών είναι να εξεταστούν οι τυχόν δυσμενείς επιδράσεις του διαλύτη με βάση την αποικοδόμηση της ουσίας αναφοράς.

Κατά το σχεδιασμό της δοκιμής, ο αναλυτής θα πρέπει να εξετάσει κατά πόσον είναι προτιμότερο να αυξηθεί το πλήθος των πειραμάτων ή η συχνότητα της δειγματοληψίας. Ο ακριβής αριθμός των απαιτούμενων φιαλών θα εξαρτηθεί από την εφαρμοζόμενη μέθοδο προσδιορισμού της αποικοδόμησης (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 τρίτο εδάφιο, παράγραφο 1.8.9.4 και παράρτημα 3).

Από κάθε δοκιμαστική φιάλη πρέπει να λαμβάνονται δύο επιμέρους δείγματα (π.χ. ποσότητες 5 ml) σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Όταν χρησιμοποιούνται πολλαπλές φιάλες, ώστε να λαμβάνεται ως δείγμα ολόκληρο το περιεχόμενο της φιάλης, αυτές θα πρέπει να είναι τουλάχιστον δύο σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 πρώτο εδάφιο).

1.8.9.3. Προετοιμασία των φιαλών για τη δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος [προαιρετική]

Στα δοκιμαστικά δοχεία προστίθενται οι απαιτούμενοι όγκοι νερού δοκιμής και ιζήματος, εφόσον είναι αναγκαίο (βλέπε παράγραφο 1.8.5). Ο τρόπος προετοιμασίας των φιαλών για τη δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος είναι ο ίδιος με την πελαγική δοκιμή (βλέπε παραγράφους 1.8.9.1 και 1.8.9.2). Χρησιμοποιούνται κατά προτίμηση φιάλες ορού ή φιάλες αναλόγου σχήματος. Οι πωματισμένες φιάλες τοποθετούνται οριζόντια σε συσκευή ανατάραξης. Οι ανοικτές φιάλες που περιέχουν μη σημασμένες με ¹⁴C μη πητικές ουσίες τοποθετούνται προφανώς όρθιες — στην περίπτωση αυτή συνιστάται μαγνητική ανάδευση και χρήση μαγνητικών ράβδων επικαλυμμένων με γυαλί. Εφόσον είναι αναγκαίο, οι φιάλες αερίζονται, ώστε να εξασφαλίζονται κατάλληλες αερόβιες συνθήκες.

1.8.9.4. Ραδιοχημικοί προσδιορισμοί

Εκτελείται έμμεση και άμεση μέτρηση του εκλυόμενου ¹⁴CO₂ (βλέπε παράρτημα 3). Το ¹⁴CO₂ προσδιορίζεται έμμεσα από τη διαφορά μεταξύ της αρχικής ραδιενέργειας του ¹⁴C στο νερό ή στο εναιώρημα δοκιμής και της συνολικής υπολειμματικής ραδιενέργειας κατά το χρόνο δειγματοληψίας, όπως μετράται μετά την οξίνιση του δείγματος μέχρι να επιτευχθεί pH 2-3 και την απομάκρυνση του CO₂. Δεδομένου ότι ο ανόργανος άνθρακας έχει απομακρυνθεί, η μετρούμενη υπολειμματική ραδιενέργεια οφείλεται στην οργανική ύλη. Ο έμμεσος προσδιορισμός του ¹⁴CO₂ δεν πρέπει να εκτελείται όταν μεταξύ των σημαντικών προϊόντων μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας περιλαμβάνονται πητικές ενώσεις (βλέπε παράρτημα 3). Εφόσον είναι δυνατόν, το εκλυόμενο ¹⁴CO₂ θα πρέπει να μετράται άμεσα (βλέπε παράρτημα 3) σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας και σε μία τουλάχιστον δοκιμαστική φιάλη. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τον έλεγχο τόσο του ισοζυγίου μάζας όσο και της διαδικασίας βιοαποικοδόμησης, αλλά εφαρμόζεται μόνο στις δοκιμές που διεξάγονται με πωματισμένες φιάλες.

Σε περίπτωση άμεσης μέτρησης του εκλυόμενου ¹⁴CO₂ κατά τη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να προβλεφθούν περισσότερες φιάλες για το σκοπό αυτό κατά την έναρξη της δοκιμής. Ο άμεσος προσδιορισμός του ¹⁴CO₂ συνιστάται όταν μεταξύ των σημαντικών προϊόντων μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας περιλαμβάνονται πητικές ενώσεις. Σε κάθε σημείο μέτρησης, οι επιπλέον δοκιμαστικές φιάλες οξινίζονται έως ότου επιτευχθεί pH 2-3 και το ¹⁴CO₂ συλλέγεται σε εσωτερικό ή εξωτερικό σύστημα απορρόφησης (βλέπε παράρτημα 3).

Εναλλακτικά, οι συγκεντρώσεις της σημασμένης με ¹⁴C ελεγχόμενης ουσίας και των σημαντικότερων προϊόντων μετατροπής μπορούν να προσδιορισθούν με ραδιοχρωματογραφία (π.χ. χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, RAD-TLC) ή με υψηλή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) με ραδιοχημική ανίχνευση.

Επίσης, μπορούν να προσδιοριστούν η κατανομή της υπολειμματικής ραδιενέργειας μεταξύ των φάσεων (βλέπε παράρτημα 1), καθώς και η υπολειμματική ελεγχόμενη ουσία και τα εναπομένοντα προϊόντα μετατροπής.

Στο τέλος της δοκιμής θα πρέπει να προσδιορίζεται το ισοζύγιο μάζας με άμεση μέτρηση του $^{14}\text{CO}_2$, χρησιμοποιώντας χωριστές δοκιμαστικές φιάλες, από τις οποίες δεν λαμβάνεται κανένα δείγμα κατά την πορεία της δοκιμής (βλέπε παράρτημα 3).

1.8.9.5. Ειδική χημική ανάλυση

Σε περίπτωση που διατίθεται ευαίσθητη ειδική αναλυτική μέθοδος, η πρωταρχική βιοαποικοδόμηση μπορεί να εκτιμηθεί μετρώντας τη συνολική υπολειμματική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, αντί να χρησιμοποιηθούν τεχνικές ραδιοσήμανσης. Εφόσον χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη ουσία (για τη μέτρηση της συνολικής ανοργανοποίησης), είναι δυνατόν να διενεργηθούν παράλληλα ειδικές χημικές αναλύσεις, με σκοπό την άντληση χρήσιμων συμπληρωματικών πληροφοριών και τον έλεγχο της διαδικασίας. Ειδικές χημικές αναλύσεις μπορούν να εκτελούνται επίσης για τη μέτρηση των προϊόντων μετατροπής που σχηματίζονται κατά την αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας, συνιστώνται δε για ουσίες των οποίων η ημιπερίοδος ανοργανοποίησης υπερβαίνει τις 60 ημέρες. Θα πρέπει να μετράται και να αναφέρεται (ως συγκέντρωση και ως εκατοστιαία αναλογία της χρησιμοποιηθείσας ποσότητας) η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και των προϊόντων μετατροπής σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Κατά κανόνα, τα προϊόντα μετατροπής που ανιχνεύονται σε ποσοστό $\geq 10\%$ της χρησιμοποιηθείσας συγκέντρωσης στον εκάστοτε χρόνο δειγματοληψίας πρέπει να ταυτοποιούνται, εκτός εάν αυτό είναι εύλογο περιττό. Θα πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο ταυτοποίησης προϊόντων μετατροπής των οποίων οι συγκεντρώσεις αυξάνονται συνεχώς κατά τη διάρκεια της μελέτης, έστω και αν οι συγκεντρώσεις τους δεν υπερβαίνουν το ανωτέρω όριο, δεδομένου ότι αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη εμμονής. Σε περίπτωση που θεωρείται πιθανή η ταχεία αβιοτική μετατροπή της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. υδρόλυση), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης των προϊόντων μετατροπής σε στείρους μάρτυρες. Η ανάγκη ποσοτικού προσδιορισμού και ταυτοποίησης των προϊόντων μετατροπής πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση, η δε σχετική αιτιολόγηση να παρέχεται στην έκθεση της δοκιμής. Οι τεχνικές εκχύλισης με οργανικό διαλύτη πρέπει να εφαρμόζονται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στην αντίστοιχη μέθοδο ανάλυσης.

Όλα τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε αεροστεγή δοχεία και σε θερμοκρασία 2 έως 4 °C, εφόσον η ανάλυση εκτελείται εντός 24 ωρών (κατά προτίμηση). Όταν τα δείγματα αποθηκεύονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, θα πρέπει να καταψύχονται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από -18 °C ή να διατηρούνται με χημικά συντηρητικά. Η μέθοδος της οξίνισης δεν συνιστάται για τη διατήρηση των δειγμάτων, διότι τα όξινα δείγματα ενδέχεται να είναι ασταθή. Σε περίπτωση που η ανάλυση δεν εκτελεστεί εντός 24 ωρών και απαιτηθεί μακρύτερος χρόνος αποθήκευσης, θα πρέπει να διεξαχθεί μελέτη σταθερότητας κατά την αποθήκευση, ώστε να αποδειχθεί η σταθερότητα των σημαντικών χημικών ουσιών υπό συνθήκες αποθήκευσης στους -18 °C ή διατήρησης με συντηρητικά. Εάν η αναλυτική μέθοδος απαιτεί εκχύλιση με διαλύτη ή παραλαβή σε στερεά φάση, αυτή θα πρέπει να διενεργηθεί αμέσως μετά τη δειγματοληψία ή μετά την αποθήκευση του δείγματος υπό ψύξη επί 24 ώρες κατ' ανώτατο όριο.

Ανάλογα με την ευαισθησία της μεθόδου ανάλυσης, ενδέχεται να απαιτηθούν δείγματα μεγαλύτερου όγκου από εκείνους που αναφέρονται στην παράγραφο 1.8.1. Η δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί άνετα με όγκους ενός λίτρου σε φιάλες χωρητικότητας 2-3 λίτρων, όγκος που επιτρέπει τη συλλογή δειγμάτων των 100 ml περίπου.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

2.1.1. Γραφική παράσταση των δεδομένων

Οι χρόνοι δειγματοληψίας στρογγυλοποιούνται σε ακέραιο αριθμό ωρών (εκτός εάν η ουσία αποικοδομείται σε σημαντικό βαθμό εντός λεπτών ή ωρών), αλλά όχι σε ακέραιο αριθμό ημερών. Σχεδιάζεται γραμμικό και ημιλογαριθμικό διάγραμμα των τιμών της υπολειμματικής ραδιενέργειας της ελεγχόμενης ουσίας (για τις σημασμένες με ^{14}C ουσίες) ή της υπολειμματικής συγκέντρωσης (για τις μη σημασμένες ουσίες), ως προς το χρόνο, (βλέπε σχήματα 1α, 1β). Εφόσον υπήρξε αποικοδόμηση, συγκρίνονται τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις φιάλες F_T με εκείνα που λαμβάνονται από τις φιάλες F_S . Εάν η απόκλιση μεταξύ των μέσων όρων των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από τις φιάλες με ελεγχόμενη ουσία (F_T) και εκείνων που λαμβάνονται από τις στείρες φιάλες (F_S) είναι μικρότερη από 10 %, μπορεί να υποτεθεί ότι η παρατηρούμενη αποικοδόμηση είναι κατά κύριο λόγο αβιοτική. Σε περίπτωση που η αποικοδόμηση στις φιάλες F_S είναι μικρότερη, οι σχετικές τιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διόρθωση των τιμών που λαμβάνονται από τις φιάλες F_T (με αφαίρεση), προκειμένου να εκτιμηθεί ο βαθμός βιοαποικοδόμησης. Εφόσον διενεργούνται προαιρετικές αναλύσεις για τα σημαντικά προϊόντα μετατροπής, θα πρέπει να παρέχονται τα διαγράμματα του σχηματισμού και της ελάττωσης των προϊόντων αυτών επιπλέον του διαγράμματος της ελάττωσης της ελεγχόμενης ουσίας.

Υπολογίζεται η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης t_L με τη βοήθεια της καμπύλης αποικοδόμησης (ημιλογαριθμικό διάγραμμα) με παρεκβολή του ευθύγραμμου τμήματος σε μηδενική αποικοδόμηση ή, εναλλακτικά, με προσδιορισμό του χρόνου αποικοδόμησης κατά 10 % περίπου (βλέπε σχήματα 1α και 1β). Με τη βοήθεια του ημιλογαριθμικού διαγράμματος, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξεως, k , καθώς και το τυπικό σφάλμα της, με γραμμική παλινδρόμηση του \ln (υπολειμματική ραδιενέργεια του ^{14}C ή συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας) προς το χρόνο. Όσον αφορά ειδικότερα τις μετρήσεις του ^{14}C , πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δεδομένα από το αρχικό ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης, επιλέγοντας κατά προτίμηση λίγα και αντιπροσωπευτικά δεδομένα και όχι περισσότερα αλλά αβέβια. Η αβεβαιότητα, στην περίπτωση αυτή, περιλαμβάνει σφάλματα που είναι συνυφασμένα με τη συνιστώμενη άμεση χρήση των μετρούμενων τιμών υπολειμματικής ραδιενέργειας του ^{14}C (βλέπε κατωτέρω). Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν η αποικοδόμηση ακολουθεί διφασικό σχήμα, είναι δυνατόν να ενδείκνυται ο υπολογισμός δύο διαφορετικών σταθερών ταχύτητας. Για το σκοπό αυτό, οριοθετούνται δύο διαφορετικές φάσεις της καμπύλης αποικοδόμησης. Η σταθερά ταχύτητας k και ο χρόνος υποδιπλασιασμού $t_{1/2} = \ln 2/k$ πρέπει να υπολογίζονται για καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες, σε περίπτωση που λαμβάνονται επιμέρους δείγματα από την ίδια φιάλη, ή χρησιμοποιώντας μέσες τιμές, όταν συλλέγεται ολόκληρο το περιεχόμενο μίας φιάλης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.2 τελευταίο εδάφιο). Εφόσον εφαρμόζεται η πρώτη από τις προαναφερόμενες διαδικασίες, η σταθερά ταχύτητας και ο χρόνος υποδιπλασιασμού θα πρέπει να αναφέρονται για καθεμία από τις επιμέρους πολλαπλές φιάλες και ως μέση τιμή με τυπικό σφάλμα. Εάν έχουν χρησιμοποιηθεί υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, η καμπύλη αποικοδόμησης είναι δυνατόν να αποκλίνει σημαντικά από την ευθεία γραμμή (ημιλογαριθμικό διάγραμμα) και να μην ισχύει η κινητική πρώτης τάξεως. Στην περίπτωση αυτή, ο προσδιορισμός του χρόνου υποδιπλασιασμού είναι επομένως άσκοπος. Ωστόσο, για μια περιορισμένη περιοχή δεδομένων, είναι δυνατόν να εφαρμοστεί κινητική ψευδοπρώτης τάξεως και να υπολογιστεί η ημιπερίοδος αποικοδόμησης DT_{50} (χρόνος αποικοδόμησης κατά 50 %). Θα πρέπει να λαμβάνεται ωστόσο υπόψη ότι η χρονική πορεία της αποικοδόμησης πέρα από την επιλεγείσα περιοχή δεδομένων δεν μπορεί να προβλεφθεί βάσει της DT_{50} , η οποία περιγράφει μόνο ένα συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων. Υπάρχουν προστά αναλυτικά εργαλεία που διευκολύνουν τους στατιστικούς υπολογισμούς και την προσαρμογή των καμπυλών και συνιστάται η χρήση λογισμικού του είδους αυτού.

Σε περίπτωση που εκτελούνται ειδικές χημικές αναλύσεις, οι σταθερές ταχύτητας και οι χρόνοι υποδιπλασιασμού για την πρωταρχική αποικοδόμηση υπολογίζονται όπως περιγράφεται ανωτέρω για τη συνολική ανοργανοποίηση. Εάν η πρωταρχική αποικοδόμηση είναι το περιοριστικό στάδιο, μπορούν ορισμένες φορές να χρησιμοποιηθούν σημεία δεδομένων από ολόκληρη την πορεία της αποικοδόμησης, διότι πρόκειται για άμεσες μετρήσεις, σε αντίθεση με τις μετρήσεις της ραδιενέργειας του ^{14}C .

Όταν χρησιμοποιούνται ουσίες σημασμένες με ^{14}C , το ισοζύγιο μάζας θα πρέπει να εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό της χρησιμοποιηθείσας αρχικής συγκέντρωσης, τουλάχιστον στο τέλος της δοκιμής.

2.1.2. Υπολειμματική ραδιενέργεια

Κατά τη βιοαποικοδόμηση του σημασμένου με ^{14}C τμήματος μιας οργανικής ουσίας, το μεγαλύτερο μέρος του ^{14}C μετατρέπεται σε $^{14}\text{CO}_2$, ενώ ένα άλλο μέρος καταναλώνεται για την ανάπτυξη της βιομάζας ή/και τη σύνθεση εξωκυτταρικών μεταβολιτών. Επομένως, η πλήρης «τελική» βιοαποικοδόμηση μιας ουσίας δεν συνεπάγεται 100 % μετατροπή του άνθρακα της σε $^{14}\text{CO}_2$. Ο ^{14}C που είναι ενσωματωμένος στα σχηματιζόμενα με βιοσύνθεση προϊόντα αποδεδμεύεται στη συνέχεια βραδέως ως $^{14}\text{CO}_2$, ως αποτέλεσμα «δευτερογενούς ανοργανοποίησης». Για τους λόγους αυτούς, τα διαγράμματα της υπολειμματικής ραδιενέργειας του οργανικού ^{14}C (που μετράται μετά την απομάκρυνση του CO_2) ή του παραγόμενου $^{14}\text{CO}_2$ ως προς το χρόνο εμφανίζουν «ουρά» μετά την ολοκλήρωση της αποικοδόμησης. Αυτό δυσχεραίνει την κινητική ερμηνεία των δεδομένων και, ως εκ τούτου, για τον υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας αποικοδόμησης θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιείται μόνο το αρχικό τμήμα της καμπύλης (μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης και πριν επιτευχθεί αποικοδόμηση κατά 50 % περίπου). Όταν η ελεγχόμενη ουσία αποικοδομείται, η συνολική υπολειμματική ραδιενέργεια του οργανικού ^{14}C είναι πάντα υψηλότερη από τη ραδιενέργεια του ^{14}C που σχετίζεται με την εναπομένουσα ανέπαφη ελεγχόμενη ουσία. Εάν η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας αποτελεί αντίδραση πρώτης τάξεως και ένα σταθερό κλάσμα a ανοργανοποιείται σε CO_2 , η αρχική κλίση της καμπύλης εξαφάνισης του ^{14}C (ολικός οργανικός άνθρακας ^{14}C ως προς το χρόνο) θα είναι a -πλάσια της κλίσης της αντίστοιχης καμπύλης για τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας (ή, ακριβέστερα, του τμήματος της ελεγχόμενης ουσίας που είναι σημασμένο με ^{14}C). Η χρησιμοποίηση των μετρήσεων της συνολικής ραδιενέργειας του οργανικού ^{14}C , χωρίς διόρθωση, συνεπάγεται ότι η υπολογιζόμενη σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης θα είναι χαμηλότερη. Στην βιβλιογραφία υπό (2)(9)(10)(11) περιγράφονται διαδικασίες για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας από τις μετρηθείσες ραδιοχημικές δραστηρότητες με βάση διάφορες απλουστευτικές υποθέσεις. Οι διαδικασίες αυτές εφαρμόζονται με ιδιαίτερη ευκολία στην περίπτωση των ταχέως αποικοδομήσιμων ουσιών.

2.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Εφόσον προκύψει ότι η σταθερά k δεν εξαρτάται από την προστιθέμενη συγκέντρωση (δηλαδή όταν η υπολογισθείσα σταθερά k είναι περίπου η ίδια για τις διάφορες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας), μπορεί να υποτεθεί ότι η σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξεως είναι αντιπροσωπευτική των συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δοκιμή δηλαδή της ελεγχόμενης ουσίας, του δείγματος νερού και της θερμοκρασίας της δοκιμής. Ένας εμπειρογνώμονας θα πρέπει να κρίνει κατά πόσον είναι δυνατή η γενίκευση ή παρεκβολή των αποτελεσμάτων της δοκιμής σε άλλα συστήματα. Σε περίπτωση που η ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις και για τον λόγο αυτό η αποικοδόμηση δεν ακολουθεί κινητική πρώτης τάξεως, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για τον απευθείας υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας πρώτης τάξεως ή του αντίστοιχου χρόνου υποδιπλασιασμού. Ωστόσο, τα δεδομένα που προκύπτουν από δοκιμή στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, μπορούν να χρησιμεύσουν για την εκτίμηση του βαθμού της συνολικής ανοργανοποίησης ή/και για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων μετατροπής.

Οι ταχύτητες άλλων διεργασιών απώλειας της ουσίας πέραν της βιοαποικοδόμησης (π.χ. υδρόλυση ή εξάτμιση), εφόσον είναι γνωστές, μπορούν να αφαιρεθούν από την ταχύτητα καθαρής απώλειας που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια της δοκιμής, ώστε να ληφθεί μία κατά προσέγγιση εκτίμηση της ταχύτητας βιοαποικοδόμησης. Τα σχετικά με την υδρόλυση δεδομένα, επί παραδείγματι, μπορούν να προκύψουν από τον στείρο μάρτυρα ή από παράλληλη δοκιμή, στην οποία χρησιμοποιούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας.

Ο έμμεσος και άμεσος προσδιορισμός του $^{14}\text{CO}_2$ (παράγραφος 1.8.9.4 και παράρτημα 3) μπορούν να χρησιμεύσουν μόνο για τον υπολογισμό του βαθμού ανοργανοποίησης της ελεγχόμενης ουσίας σε CO_2 . Η ραδιοχρωματογραφία (RAD-TLC) ή η γρήγη χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτική ανάλυση της σημασμένης με ^{14}C ελεγχόμενης ουσίας και του σχηματισμού σημαντικών προϊόντων μετατροπής (παράγραφος 1.8.9.4 τρίτο εδάφιο). Για τον άμεσο υπολογισμό του χρόνου υποδιπλασιασμού είναι απαραίτητο να μην συνυπάρχουν σημαντικά προϊόντα μετατροπής (οριζόμενα με βάση τη συγκέντρωσή τους, η οποία είναι $\geq 10\%$ της χρησιμοποιηθείσας ποσότητας ελεγχόμενης ουσίας). Σε περίπτωση παρουσίας σημαντικών προϊόντων μετατροπής, όπως ορίζονται ανωτέρω, απαιτείται λεπτομερής αξιολόγηση των δεδομένων. Αυτή μπορεί να περιλαμβάνει επανάληψη της δοκιμής ή/και ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής (βλέπε παράγραφο 1.8.9.5 πρώτο εδάφιο), εκτός εάν η πορεία των προϊόντων μετατροπής μπορεί να εκτιμηθεί ευλόγως βάσει προηγούμενης εμπειρίας (π.χ. πληροφοριών για την οδό της αποικοδόμησης). Δεδομένου ότι η αναλογία του άνθρακα της ελεγχόμενης ουσίας που μετατρέπεται σε CO_2 ποικίλλει (εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και από τα άλλα διαθέσιμα υποστρώματα, τις συνθήκες της δοκιμής και τη μικροβιακή χλωρίδα), η παρούσα δοκιμή δεν επιτρέπει την απευθείας εκτίμηση της τελικής βιοαποικοδόμησης, όπως στην περίπτωση της δοκιμής ελάττωσης του DOC. Το αποτέλεσμα όμως είναι ανάλογο εκείνου που λαμβάνεται με τη δοκιμή αναπνευσιομετρίας. Ο βαθμός ανοργανοποίησης θα είναι επομένως μικρότερος ή ίσος με τον ελάχιστο βαθμό τελικής βιοαποικοδόμησης. Για να ληφθεί πληρέστερη εικόνα της τελικής βιοαποικοδόμησης (ανοργανοποίηση και ενσωμάτωση στη βιομάζα), θα πρέπει να αναλυθεί η κατανομή του ^{14}C μεταξύ των φάσεων στο τέλος της δοκιμής (βλέπε παράρτημα 1). Ο ^{14}C στο σωματιδιακό υλικό θα συνίσταται στον ^{14}C που είναι ενσωματωμένος στη βακτηριακή βιομάζα και στον ^{14}C που έχουν ροφήσει τα οργανικά σωματίδια.

2.3. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εάν η ουσία αναφοράς δεν αποικοδομείται εντός του αναμενόμενου χρονικού διαστήματος (το οποίο για την ανιλίνη και το βενζοϊκό νάτριο είναι συνήθως μικρότερο από δύο εβδομάδες), η εγκυρότητα της δοκιμής είναι αμφισβητήσιμη και πρέπει να ελεγχθεί περαιτέρω, ή, εναλλακτικά, θα πρέπει να επαναληφθεί η δοκιμή με νέο δείγμα νερού. Σε μία κυκλική δοκιμή (ring-test) ISO της μεθόδου, στην οποία συμμετείχαν επτά ευρωπαϊκά εργαστήρια, οι προσαρμοσμένες σταθερές ταχύτητας της αποικοδόμησης της ανιλίνης κυμάνθηκαν από 0,3 έως 1,7 ημέρες⁻¹ με μέσο όρο 0,8 ημέρες⁻¹ στους 20 °C και τυπικό σφάλμα $\pm 0,4$ ημέρες⁻¹ ($t_{1/2} = 0,9$ ημέρες). Η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης ήταν συνήθως 1 έως 7 ημέρες. Τα ύδατα που εξετάστηκαν είχε αναφερθεί ότι περιείχαν βακτηριακή βιομάζα η οποία αντιστοιχούσε σε 10^3 — 10^4 μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU) ανά ml. Οι ταχύτητες αποικοδόμησης στα πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία ύδατα της κεντρικής Ευρώπης ήταν μεγαλύτερες εκείνων που παρατηρήθηκαν στα oligοτροφικά ύδατα της βόρειας Ευρώπης. Το γεγονός αυτό είναι δυνατόν να οφείλεται στη διαφορετική τροφική κατάσταση των εν λόγω υδάτων ή σε προηγούμενη έκθεση σε χημικές ουσίες.

Η συνολική ανάκτηση (ισοζύγιο μάζας) στο τέλος του πειράματος θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90 % και 110 % για τις ραδιοσημασμένες ουσίες, ενώ, για τις μη σημασμένες ουσίες, η αρχική ανάκτηση κατά την έναρξη του πειράματος θα πρέπει να είναι 70 % έως 110 %. Ωστόσο, οι αναφερόμενες περιοχές τιμών είναι ενδεικτικές και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως κριτήρια για την αποδοχή της δοκιμής.

3. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση της δοκιμής πρέπει να αναφέρεται σαφώς ο τύπος της μελέτης — πελαγική δοκιμή ή δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος — και να περιλαμβάνονται τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία και ουσία(ες) αναφοράς:

- κοινές ονομασίες, χημικές ονομασίες (κατά IUPAC ή/και ονομασίες CAS), αριθμοί CAS, συντακτικοί τύποι (με ένδειξη της θέσης του ^{14}C σε περίπτωση που χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ουσία) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς (βλέπε παραγράφους 1.5 και 1.6),
- χημικές ονομασίες, αριθμοί CAS, συντακτικοί τύποι (με ένδειξη της θέσης του ^{14}C σε περίπτωση που χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ουσία) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων μετατροπής,
- καθαρότητα (προσμίξεις) της ελεγχόμενης ουσίας και της ή των ουσιών αναφοράς,
- ραδιοχημική καθαρότητα της σημασμένης χημικής ουσίας και ειδική ραδιενέργεια (κατά περίπτωση).

Επιφανειακά ύδατα:

Πρέπει να παρέχονται τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία σχετικά με το ληφθέν δείγμα νερού:

- θέση και περιγραφή του χώρου δειγματοληψίας συμπεριλαμβανομένου, εφόσον είναι δυνατόν, του ιστορικού της μόλυνσης,
- ημερομηνία και χρόνος δειγματοληψίας,
- θρεπτικά στοιχεία (ολικό N, αμμώνιο, νιτρώδη, νιτρικά, ολικός P, διαλελυμένα ορθοφωσφορικά),
- βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα,
- εμφάνιση του δείγματος (π.χ. χρώμα και θολρότητα),
- διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) και ολικός οργανικός άνθρακας (TOC),
- βιολογικός απαιτούμενο οξυγόνο (BOD),
- θερμοκρασία και pH στον τόπο και χρόνο δειγματοληψίας,
- οξυγόνο ή οξειδοαναγωγικό δυναμικό (υποχρεωτικό μόνο εφόσον οι αερόβιες συνθήκες δεν είναι προφανείς),
- αλατότητα ή αγωγιμότητα (για τα θαλάσσια και τα υφάλμυρα ύδατα),
- αιωρούμενα στερεά (σε περίπτωση θολερού δείγματος),
- ενδεχομένως, άλλες σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον τόπο της δειγματοληψίας κατά το χρόνο διενέργειάς της (π.χ. τρέχοντα ή ιστορικά δεδομένα για την ταχύτητα ροής ποταμών ή θαλάσσιων ρευμάτων, για σημαντικές απορρίψεις στην περιοχή και τα είδη των απορρίψεων αυτών, τις καιρικές συνθήκες πριν από το χρόνο δειγματοληψίας),

και προαιρετικά:

- μικροβιακή βιομάζα (π.χ. άμεση καταμέτρηση με πορτοκαλί της ακριδίνης ή μονάδες σχηματισμού αποικιών),
- ανόργανος άνθρακας,
- συγκέντρωση χλωροφύλλης-α ως ειδικό μέτρο της βιομάζας φυκών.

Εάν διενεργείται δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, θα πρέπει να παρέχονται επιπλέον τα ακόλουθα στοιχεία:

- βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το ίζημα,
- εμφάνιση του ιζήματος (π.χ. χρωματισμένο, λασπώδες, αργιλώδες ή αμμώδες),
- υφή (π.χ. ποσοστό επί τοις εκατό αδρομερούς άμμου, λεπτής άμμου, ιλύος και αργίλου),
- ξηρό βάρος, σε g/l, των αιωρούμενων στερεών, συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) ή απώλεια βάρους κατά την ανάφλεξη, ως μέτρο της περιεχόμενης οργανικής ύλης,
- pH,
- οξυγόνο ή οξειδοαναγωγικό δυναμικό (υποχρεωτικό μόνον εφόσον οι αερόβιες συνθήκες δεν είναι προφανείς),

Συνθήκες δοκιμής:

- χρόνος που μεσολάβησε από τη δειγματοληψία μέχρι τη χρήση του δείγματος στην εργαστηριακή δοκιμή, αποθήκευση και προκατεργασία του δείγματος, ημερομηνίες διεξαγωγής των μελετών,
- ποσότητα χρησιμοποιηθείσας ελεγχόμενης ουσίας, συγκέντρωση δοκιμής και ουσία αναφοράς,
- τεχνική εισαγωγής της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της τυχόν χρήσης διαλυτών,

- όγκος των χρησιμοποιηθέντων επιφανειακών υδάτων και του ιζήματος (εφόσον χρησιμοποιήθηκε) και όγκος του δείγματος που ελήφθη για ανάλυση σε κάθε διάστημα,
 - περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος συστήματος δοκιμής,
- εφόσον δεν επιβάλλεται να διατηρούνται συνθήκες σκότους, πληροφορίες για το «διάχυτο φως»,
- πληροφορίες σχετικά με την ή τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των στείων μαρτύρων (π.χ. θερμοκρασία, χρόνος και αριθμός κατεργασιών σε αυτόκλειστο),
 - θερμοκρασία επώασης,
 - πληροφορίες σχετικά με τις τεχνικές ανάλυσης και την ή τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τις ραδιοχημικές μετρήσεις, καθώς και για τον έλεγχο του ισοζυγίου μάζας και τον προσδιορισμό της κατανομής μεταξύ των φάσεων (εφόσον διενεργήθηκε),
 - πλήθος προσδιορισμών (replicates).

Αποτελέσματα:

- ποσοστά ανάκτησης (βλέπε παράγραφο 1.7.1),
- επαναληπτικότητα και ευαισθησία των μεθόδων ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων του ορίου ανίχνευσης (LOD) και του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) (βλέπε παράγραφο 1.7.2),
- όλα τα μετρηθέντα δεδομένα (συμπεριλαμβανομένων των χρονικών σημείων δειγματοληψίας) και οι υπολογισθείσες τιμές, υπό μορφή πίνακα, καθώς και οι καμπύλες αποικοδόμησης αναφέρεται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και για καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης της κλίσης του λογαριθμικού διαγράμματος, η εκτιμηθείσα λανθάνουσα φάση και μία σταθερά ταχύτητας πρώτης ή ψευδο-πρώτης τάξεως (εφόσον είναι δυνατόν), καθώς και η αντίστοιχη ημιπερίοδος αποικοδόμησης (ή ο χρόνος υποδιπλασιασμού, t_{50}),
- οι σημαντικές τιμές ως μέσοι όροι των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες, π.χ. διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης και ημιπερίοδος αποικοδόμησης (ή t_{50}),
- χαρακτηρισμός του συστήματος ως κατάλληλου ή μη, με κριτήρια την όψη της καμπύλης αποικοδόμησης και την ενδεχόμενη επίδραση της συγκέντρωσης δοκιμής,
- τα αποτελέσματα του τελικού ελέγχου του ισοζυγίου μάζας και τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της κατανομής μεταξύ των φάσεων (εφόσον διατίθενται),
- το κλάσμα του ανοργανοποιημένου ^{14}C και, εφόσον εκτελούνται ειδικές αναλύσεις, ο τελικός βαθμός πρωταρχικής αποικοδόμησης,
- ταυτοποίηση, μοριακή συγκέντρωση και ποσοστό επί τοις εκατό των προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν και των σημαντικών προϊόντων μετατροπής (βλέπε παράγραφο 1.8.9.5 πρώτο εδάφιο), κατά περίπτωση,
- προτεινόμενη πορεία μετατροπής, κατά περίπτωση,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test
2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.
3. Μέθοδος δοκιμής Γ.23. Αερόβια και αναερόβια μετατροπή στο έδαφος.
4. Μέθοδος δοκιμής Γ.24. Αερόβια και αναερόβια μετατροπή σε υδατικά ιζηματικά συστήματα.
5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.
6. ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Ποιότητα νερού — Κατευθυντήριες οδηγίες για την παρασκευή και την επεξεργασία των ελάχιστα υδατοδιαλυτών οργανικών ενώσεων με προοπτική την αξιολόγηση της βιοδιασπασιμότητά τους σε υδατικό περιβάλλον.
 8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).
 9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 394-401.
 10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ¹⁴C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 274-283.
 11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.
-

Προσάρτημα 1

Κατανομή του ^{14}C μεταξύ των φάσεων

Προκειμένου να ελεγχθεί η εφαρμοσθείσα διαδικασία, οι συνήθεις μετρήσεις της υπολειμματικής συνολικής ραδιενέργειας του οργανικού ^{14}C (TOA) θα πρέπει να συμπληρωθούν με μετρήσεις του ισοζυγίου μάζας, όπου συμπεριλαμβάνεται ο άμεσος προσδιορισμός του εκλυόμενου $^{14}\text{CO}_2$ μετά την παγίδευσή του σε σύστημα απορρόφησης (βλέπε παράρτημα 3). Ο σχηματισμός $^{14}\text{CO}_2$ συνιστά, καθενατόν, άμεση απόδειξη βιοαποικοδόμησης, σε αντιδιαστολή με την αβιοτική αποικοδόμηση ή με άλλους μηχανισμούς απώλειας, όπως η εξάτμιση και η ρόφηση. Πρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες, χαρακτηριστικές της βιοαποικοδομησιμότητας, μπορούν να ληφθούν από τον προσδιορισμό της κατανομής της TOA μεταξύ της διαλελυμένης φάσης (ραδιενέργεια διαλελυμένου οργανικού ^{14}C , DOA) και της σωματιδιακής φάσης (ραδιενέργεια σωματιδιακού οργανικού ^{14}C , POA), μετά τον διαχωρισμό των σωματιδίων με διήθηση μέσω μεμβράνης ή φυγοκέντρωση. Η POA περιλαμβάνει την ελεγχόμενη ουσία που έχει ροφηθεί στη μικροβιακή βιομάζα ή σε άλλα σωματίδια, καθώς και τον άνθρακα της ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού και, επομένως, ενσωματώθηκε στο σωματιδιακό κλάσμα της βιομάζας. Ο σχηματιζόμενος διαλελυμένος οργανικός ^{14}C μπορεί να υπολογισθεί με βάση τη DOA στο τέλος της βιοαποικοδόμησης (οριζόντιο τμήμα της καμπύλης της αποικοδόμησης ως προς το χρόνο).

Για την εκτίμηση της κατανομής του υπολειμματικού ^{14}C μεταξύ των φάσεων σε επιλεγμένα δείγματα, τα δείγματα διηθούνται μέσω μεμβράνης από υλικό που δεν προσροφά σημαντικές ποσότητες ελεγχόμενης ουσίας (οι πολυανθρακικοί ηθμοί θεωρούνται κατάλληλοι), με πόρους διαμέτρου 0,22 μm ή 0,45 μm . Εάν η ρόφηση της ελεγχόμενης ουσίας στον ηθμό είναι τόσο σημαντική ώστε να μην μπορεί να αγνοηθεί (πρέπει να ελέγχεται πριν από την έναρξη της δοκιμής), η διήθηση μπορεί να αντικατασταθεί από φυγοκέντρωση σε υψηλή ταχύτητα (2 000 g x 10 min).

Το διήθημα ή το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρωσης υποβάλλεται στη διαδικασία που περιγράφεται στο παράρτημα 3 για τα μη διηθημένα δείγματα. Οι διηθητικές μεμβράνες διαλύονται σε κατάλληλο υγρό σπινθηρισμού και ακολουθεί καταμέτρηση, ως συνήθως, χρησιμοποιώντας, κατά κανόνα, μόνο τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου για να διορθωθεί η αναχαιτίση (quenching) ή μέσο οξειδωσης του δείγματος. Εάν διενεργήθηκε φυγοκέντρωση, παρασκευάζεται εναιώρημα του σβωλοποιημένου σωματιδιακού κλάσματος σε 1-2 ml απεσταγμένου νερού, το οποίο μεταφέρεται στη συνέχεια σε φιαλίδιο σπινθηρισμού. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με 1 ml απεσταγμένου νερού και τα εκπλύματα μεταφέρονται στο φιαλίδιο. Εφόσον χρειάζεται, το εναιώρημα μπορεί να ενσωματωθεί σε πηκτή για καταμέτρηση με υγρό σπινθηρισμό.

Προσάρτημα 2

Ημισυνεχής διαδικασία

Για την επαρκή αποικοδόμηση των έμμονων ουσιών ενδέχεται να χρειαστεί παρατεταμένη επώαση επί πολλούς μήνες. Κανονικά, η διάρκεια της δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 60 ημέρες, εκτός εάν τα χαρακτηριστικά του αρχικού δείγματος νερού διατηρούνται με ανανέωση του εναιωρήματος της δοκιμής. Ωστόσο, μπορεί να παραταθεί έως 90 ημέρες, κατ' ανώτατο όριο, χωρίς ανανέωση του εναιωρήματος δοκιμής, εάν η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας έχει αρχίσει εντός των πρώτων 60 ημερών.

Στη μακράς διάρκειας επώαση, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μείωση της ποικιλίας της μικροβιακής χλωρίδας, εξαιτίας διαφόρων μηχανισμών απώλειας και της ενδεχόμενης εξάντλησης των βασικών θρεπτικών στοιχείων και των πρωτευνόντων ανθρακούχων υποστρωμάτων από το δείγμα νερού. Για τον ορθό προσδιορισμό της ταχύτητας αποικοδόμησης των βραδέως αποικοδομούμενων ουσιών συνιστάται, επομένως, η διεξαγωγή ημισυνεχούς δοκιμής. Η δοκιμή θα πρέπει να αρχίζει με ημισυνεχή διαδικασία εφόσον, βάσει προηγούμενης εμπειρίας, αναμένεται ότι θα απαιτηθεί τρίμηνη επώαση για την αποικοδόμηση της ουσίας κατά 20 %. Εναλλακτικά, η κανονική δοκιμή διαλείποντος έργου μπορεί να μετατραπεί σε ημισυνεχή δοκιμή εάν δεν παρατηρηθεί αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας εντός 60 περίπου ημερών δοκιμής με τη διαδικασία διαλείποντος έργου. Η ημισυνεχής διαδικασία μπορεί να διακοπεί και η δοκιμή να συνεχιστεί με τη διαδικασία διαλείποντος έργου, εφόσον καταγραφεί σημαντική αποικοδόμηση (π.χ. > 20 %).

Στην ημισυνεχή δοκιμή, περίπου το ένα τρίτο του όγκου του εναιωρήματος δοκιμής αντικαθίσταται ανά δύο εβδομάδες από νερό που έχει συλλεγεί πρόσφατα, στο οποίο προστίθεται η ελεγχόμενη ουσία στην αρχική της συγκέντρωση. Ομοίως, εφόσον διεξάγεται η προαιρετική δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, προστίθεται στο νερό αναπλήρωση ιζήμα στην αρχική συγκέντρωση (μεταξύ 0,01 και 1 g/l). Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής με εναιώρημα στερεών ιζήματος, έχει σημασία να διατηρείται το σύστημα σε πλήρη διασπορά και κατά τη διάρκεια της ανανέωσης του νερού και ο χρόνος παραμονής να είναι ο ίδιος για τα στερεά και για το νερό, διότι, στην αντίθετη περίπτωση, δεν θα υφίσταται πλέον η επιδιωκόμενη ομοιότητα με ομοιογενές υδατικό σύστημα χωρίς καθορισμένες φάσεις. Για το λόγο αυτό, όταν εφαρμόζεται η ημισυνεχής διαδικασία, είναι προτιμότερο να επιλέγεται αρχική συγκέντρωση εναιωρούμενου ιζήματος στο χαμηλότερο άκρο της καθορισμένης περιοχής.

Η προδιαγραφή για την προσθήκη ελεγχόμενης ουσίας συνεπάγεται ότι δεν σημειώνεται υπέρβαση της αρχικής συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας με τη μερική ανανέωση του εναιωρήματος δοκιμής και, ως εκ τούτου, αποφεύγεται η προσαρμογή που διαπιστώνεται συχνά με υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας. Δεδομένου ότι η διαδικασία περιλαμβάνει και επανεποψάλμιση και συμπλήρωση των εξαντληθέντων θρεπτικών στοιχείων και πρωτευνόντων υποστρωμάτων, η μικροβιακή ποικιλότητα αποκαθίσταται και η διάρκεια της δοκιμής μπορεί να παραταθεί θεωρητικά επ' άπειρον. Αξίζει να σημειωθεί ότι, όταν εφαρμόζεται η ημισυνεχής διαδικασία, η υπολειμματική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να διορθωθεί για να ληφθούν υπόψη οι προστιθέμενες και αφαιρούμενες ποσότητες ελεγχόμενης ουσίας σε κάθε ανανέωση. Στις περιπτώσεις ελάχιστης ρόφησης της ένωσης, μπορεί να χρησιμοποιείται αδιακρίτως είτε η συνολική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας είτε η συγκέντρωση της διαλελυμένης ουσίας. Η ρόφηση είναι αμελητέα (< 5 %) υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες (0,1-1 g στερεών/l) για ουσίες με $\log K_{ow} < 3$ (ισχύει για ουδέτερες, λιπόφιλες ενώσεις). Αυτό επεξηγείται με το ακόλουθο παράδειγμα υπολογισμού. Χονδρικά, 0,1 g/l στερεών αντιστοιχεί σε 10 mg άνθρακα ανά λίτρο (κλάσμα άνθρακα, $f_c = 0,01$). Εάν:

$$\log K_{ow} \text{ (της ελεγχόμενης ουσίας)} = 3$$

$$K_{oc} = 0,42 \times K_{ow}$$

$$\text{Συντελεστής κατανομής, } K_d = f_c \times K_{oc}$$

τότε, το διαλελυμένο κλάσμα της συνολικής συγκέντρωσης (C-νερού (C_w)/C-συνολικό (C_t)) ισούται με:

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

Προσάρτημα 3

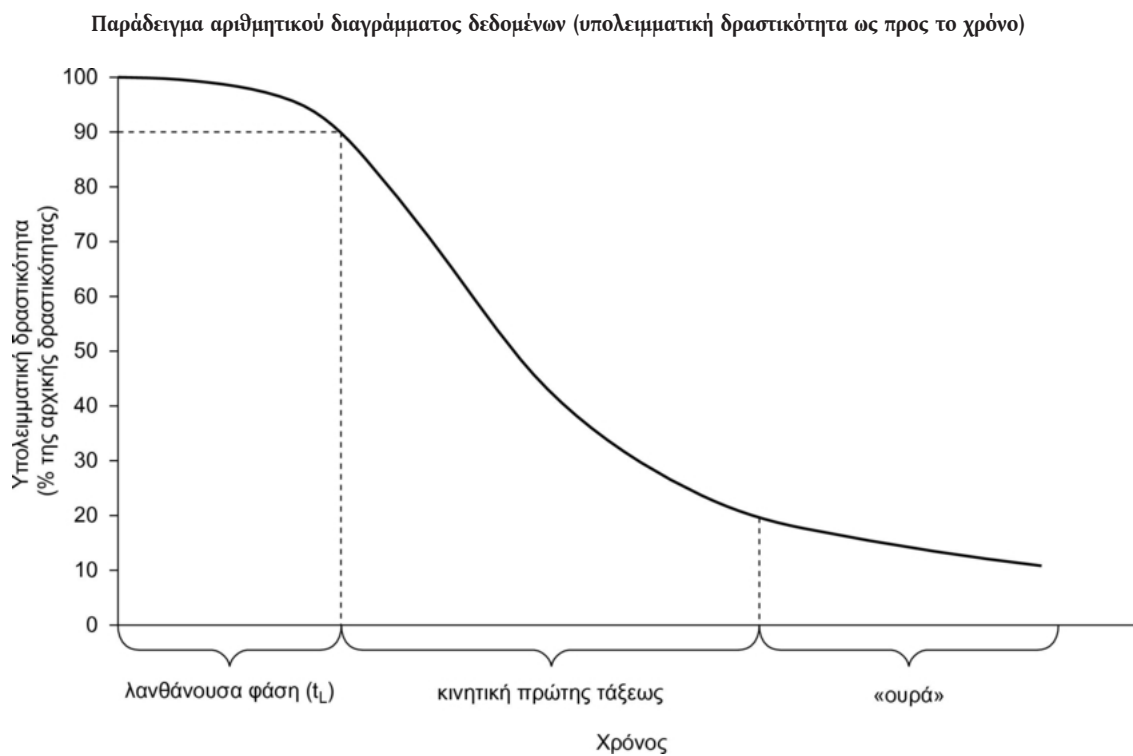
Προσδιορισμός του $^{14}\text{CO}_2$ **Έμμεσος προσδιορισμός του $^{14}\text{CO}_2$**

Για μετρήσεις καθημερινής πρακτικής και εφόσον η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι πτητική και δεν μετατρέπεται σε πτητικά προϊόντα μετατροπής, η άμεση μέθοδος αποτελεί, κατά κανόνα, την ταχύτερη και ακριβέστερη μέθοδο προσδιορισμού. Αδιήθητα δείγματα όγκου 5 ml, επί παραδείγματι, μεταφέρονται σε φιαλίδια σπινθηρισμού. Η ενδεδειγμένη αρχική ραδιενέργεια των δειγμάτων κυμαίνεται μεταξύ 5 000 dpm και 10 000 dpm (80-170 Bq), ενώ η ελάχιστη αρχική ραδιενέργεια είναι περίπου 1 000 dpm. Το CO_2 θα πρέπει να απομακρυνθεί μετά από οξίνιση έως pH 2-3 με 1-2 σταγόνες πυκνού H_3PO_4 ή HCl . Η απομάκρυνση του CO_2 μπορεί να επιτευχθεί με διοχέτευση φυσαλίδων αέρα επί μισή έως μία ώρα περίπου. Άλλος τρόπος είναι η ζωρή ανατάραξη των φιαλιδίων επί 1-2 ώρες (επί παραδείγματι στη συσκευή ανατάραξης μικροτριβλίων) ή ηπιότερη ανατάραξη επί μία νύκτα. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας απομάκρυνσης του CO_2 πρέπει να ελέγχεται (παρατείνοντας τη διάρκεια του αερισμού ή της ανατάραξης). Στη συνέχεια, προστίθεται υγρό σπινθηρισμού, κατάλληλο για την απαρίθμηση σε υδάτινα δείγματα, το δείγμα ομοιογενεοποιείται σε αναδευτήρα περιδίνισης και η ραδιενέργεια προσδιορίζεται με απαρίθμηση υγρού σπινθηρισμού, αφού αφαιρεθεί η ραδιενέργεια υποβάθρου που διαπιστώθηκε κατά τη δοκιμή με τυφλούς μάρτυρες (F_B). Εφόσον το νερό δοκιμής δεν έχει ιδιαίτερα έντονο χρώμα ή υψηλή συγκέντρωση σωματιδίων, τα δείγματα παρουσιάζουν κανονικά ομοιομορφη αναχαιτίση και αρκεί η διόρθωση για την αναχαιτίση με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου. Σε περίπτωση που το νερό δοκιμής έχει έντονο χρώμα, μπορεί να χρειαστεί διόρθωση για την αναχαιτίση με χρήση εσωτερικού προτύπου. Εάν η συγκέντρωση των σωματιδίων είναι υψηλή, ενδέχεται να μην είναι δυνατόν να επιτευχθεί ομοιογένεια του διαλύματος ή της πηκτής ή να υπάρχει μεγάλη διαφορά αναχαιτίσης μεταξύ των δειγμάτων. Στην περίπτωση αυτή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος απαρίθμησης που περιγράφεται κατωτέρω για τους πολλούς δοκιμής. Όταν πρόκειται για δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, μπορεί να διενεργηθεί έμμεση μέτρηση του $^{14}\text{CO}_2$, λαμβάνοντας ομοιογενές δείγμα όγκου 10 ml από το υδατικό εναιώρημα δοκιμής και διαχωρίζοντας τις φάσεις με φυγοκέντρωση σε κατάλληλη ταχύτητα (π.χ. 40 000 m/s^2 επί 15 λεπτά). Η υδατική φάση υποβάλλεται κατόπιν στη διαδικασία που περιγράφεται ανωτέρω. Η ραδιενέργεια του ^{14}C στη σωματιδιακή φάση (ΡΟΑ) προσδιορίζεται σχηματίζοντας νέο εναιώρημα του ιζήματος σε μικρό όγκο απεσταγμένου νερού, το οποίο μεταφέρεται σε φιαλίδια σπινθηρισμού, όπου προστίθεται υγρό σπινθηρισμού ώστε να σχηματιστεί πηκτή (διατίθενται για το σκοπό αυτό ειδικά υγρά σπινθηρισμού). Ανάλογα με το είδος των σωματιδίων (π.χ. περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό), μπορεί να είναι εφικτή η διάσπαση του δείγματος με διαλύτη ιστών επί μία νύκτα και, στη συνέχεια, η ομοιογενεοποίησή του με τη βοήθεια αναδευτήρα περιδίνισης πριν προστεθεί το υγρό σπινθηρισμού. Εναλλακτικά, η ΡΟΑ μπορεί να προσδιοριστεί με καύση σε περίσσεια οξυγόνου χρησιμοποιώντας ένα μέσο οξείδωσης του δείγματος. Κατά την απαρίθμηση, πρέπει να περιλαμβάνονται πάντα εσωτερικά πρότυπα, ενώ ενδέχεται να χρειαστούν διορθώσεις για την αναχαιτίση με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου για κάθε επιμέρους δείγμα.

Άμεσος προσδιορισμός του $^{14}\text{CO}_2$

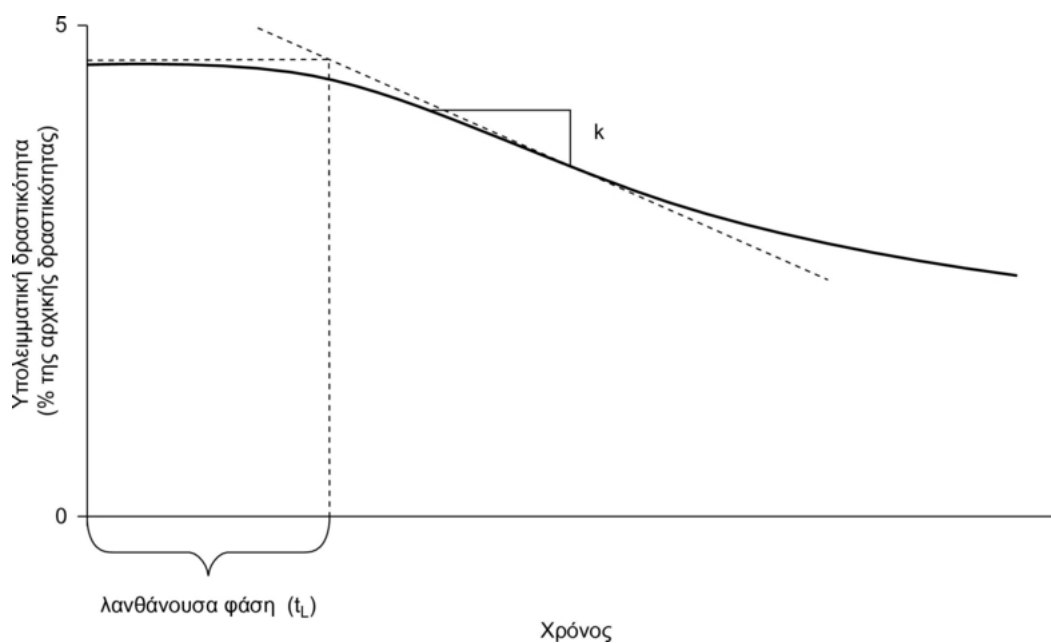
Εάν εκτελείται άμεση μέτρηση του εκλυόμενου $^{14}\text{CO}_2$, απαιτείται προετοιμασία περισσότερων φιαλών στην αρχή της δοκιμής, συλλογή του περιεχομένου των δοκιμαστικών φιαλών σε κάθε σημείο μέτρησης μετά από οξίνισή του έως pH 2-3 και συλλογή του $^{14}\text{CO}_2$ σε εσωτερικό (τοποθετούμενο σε κάθε δοκιμαστική φιάλη στην αρχή της δοκιμής) ή εξωτερικό σύστημα απορρόφησης. Για τον σκοπό αυτό είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν άλαλη (π.χ. διάλυμα NaOH 1 N, ή σφαιρίδιο NaOH), αιθανολαμίνη ή αιθανολαμινόχο υλικό, καθώς και τα διαθέσιμα στο εμπόριο απορροφητικά υλικά. Οι χρησιμοποιούμενες για τον άμεσο προσδιορισμό του $^{14}\text{CO}_2$ φιάλες πρέπει να είναι πωματισμένες, επί παραδείγματι, με διαφράγματα από βουτυλοκαουτσούκ.

Σχήμα 1α



Σχήμα 1β

Παράδειγμα ημιλογαριθμικού διαγράμματος δεδομένων (λογάριθμος της υπολειμματικής δραστηριότητας ως προς το χρόνο)



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

Γ.26. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *LEMNA SP.*

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 221 (2006) του ΟΟΣΑ (1). Οι αρχές της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) συμφώνησαν γενικά ότι η δοκιμή σε *Lemna* αποτελεί κατάλληλη εναλλακτική επιλογή αντί της δοκιμής σε φύκη για τις ουσίες έντονου χρώματος (2)(3).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών προορίζεται για την εκτίμηση της τοξικότητας ουσιών για τα υδρόβια φυτά των γλυκών υδάτων του γένους *Lemna* (κοινώς, λέμνα ή φακή του νερού). Η μέθοδος βασίζεται στις υφιστάμενες κατευθυντήριες γραμμές (4)(5)(6)(7)(8)(9), αλλά περιλαμβάνει τροποποιήσεις των αντίστοιχων μεθόδων, οι οποίες αποτυπώνουν τα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνητικών εργασιών και διαβουλεύσεων για ορισμένα ζητήματα καίριας σημασίας. Η προτεινόμενη μέθοδος επικυρώθηκε με διεθνή κυκλική δοκιμή (ring-test) (10).

Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται η διεξαγωγή δοκιμής τοξικότητας με χρήση των ειδών *Lemna gibba* και *Lemna minor*, που έχουν μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν το αντικείμενο των προαναφερόμενων προτύπων. Η συστηματική κατάταξη του φυτού *Lemna* spp. είναι δύσκολη, διότι περιπλέκεται από την ύπαρξη πληθώρας φαινοτύπων. Παρόλο που μπορεί να παρουσιαστεί γενετική μεταβλητότητα της απόκρισης της λέμνας σε τοξικούς παράγοντες, τα σχετικά με αυτό το αίτιο μεταβλητότητας δεδομένα δεν επαρκούν, προς το παρόν, ώστε να υποδειχθεί η χρήση συγκεκριμένου κλώνου κατά την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου. Σημειωτέον ότι η δοκιμή δεν διεξάγεται με αξενικές (χωρίς παρουσία ξένων οργανισμών) καλλιέργειες, λαμβάνονται όμως μέτρα σε διάφορα στάδια της διαδικασίας δοκιμής για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης από άλλους οργανισμούς.

Περιγράφεται λεπτομερώς η διεξαγωγή της δοκιμής με ανανέωση (ημιστατικό και συνεχές σύστημα) και χωρίς ανανέωση (στατικό σύστημα) του διαλύματος δοκιμής. Ανάλογα με τους στόχους της δοκιμής και τις απαιτήσεις των κανονιστικών ρυθμίσεων, συνιστάται να εξετάζεται το ενδεχόμενο εφαρμογής των ημιστατικών και των συνεχών τεχνικών, π.χ. στην περίπτωση των ουσιών που εξαφανίζονται ταχέως από το διάλυμα, λόγω εξάτμισης, φωτοαποικοδόμησης, καθίζησης ή βιοαποικοδόμησης. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στη δημοσίευση (11).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί και συντμήσεις:

Βιομάζα: το ξηρό βάρος της ζώσας ύλης την οποία περιέχει ένας πληθυσμός. Στην παρούσα δοκιμή, μετρώνται συνήθως υποκατάστατα της βιομάζας, όπως ο αριθμός θαλλών ή η θαλλική επιφάνεια. Ως εκ τούτου, ο όρος βιομάζα αναφέρεται και σε αυτά τα υποκατάστατα μέτρα.

Χλόρωση: ο κίτρινος χρωματισμός του θαλλικού ιστού.

Κλώνος: οργανισμός ή κύτταρο που δημιουργείται με αγενή πολλαπλασιασμό από ένα μόνο άτομο. Συνεπώς, τα μέλη του ίδιου κλώνου είναι γενετικώς πανομοιότυπα.

Αποικία: συσσωμάτωμα μητρικών και θυγατρικών θαλλών (συνήθως 2 έως 4), συνδεδεμένων μεταξύ τους. Μερικές φορές, αναφέρεται ως φυτό.

EC_x: η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, διαλελυμένης στο υλικό δοκιμής, η οποία προκαλεί μείωση της ανάπτυξης της λέμνας κατά x % (π.χ. 50 %) εντός της δηλούμενης περιόδου έκθεσης (πρέπει να αναφέρεται επακριβώς, εάν διαφέρει από την πλήρη ή κανονική διάρκεια της δοκιμής). Για να δηλώνεται σαφώς αν η τιμή EC έχει προκύψει από τον ρυθμό ανάπτυξης ή από την απόδοση, χρησιμοποιούνται τα σύμβολα «E_tC» και «E_yC», αντίστοιχα, ακολουθούμενα από τη μεταβλητή που μετρήθηκε, π.χ. E_tC (αριθμός θαλλών).

Συνεχής δοκιμή: η δοκιμή στην οποία τα διαλύματα δοκιμής αντικαθίστανται συνεχώς.

Θαλλός: ατομική/μεμονωμένη «φυλλοειδής» δομή του φυτού λέμνα. Πρόκειται για τη μικρότερη μονάδα, δηλαδή άτομο, με ικανότητα αναπαραγωγής.

Κυφότητα: οι θαλλοί που εμφανίζουν εξόγκωμα ή διόγκωση.

Ανάπτυξη: η αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής — αριθμός θαλλών, ξηρό βάρος, υγρό (νωπό) βάρος ή θαλλική επιφάνεια— στη διάρκεια της δοκιμής.

Ρυθμός ανάπτυξης (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης): η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας κατά την περίοδο έκθεσης.

Κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC, από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων *Lowest Observed Effect Concentration*): η χαμηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση, στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης (με $p < 0,05$) υπό την επίδραση της ουσίας, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, εντός δεδομένου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι ελεγχόμενες συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τη LOEC πρέπει να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση όπου δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Μετρούμενες μεταβλητές: κάθε είδους μεταβλητή που μετράται, προκειμένου να εκφραστεί το τελικό σημείο της δοκιμής με χρήση μίας ή περισσότερων διαφορετικών μεταβλητών απόκρισης. Στην παρούσα μέθοδο, μετρούμενες μεταβλητές είναι ο αριθμός θαλλών, η θαλλική επιφάνεια, το υγρό βάρος και το ξηρό βάρος.

Μονοκαλλιέργεια: καλλιέργεια με ένα μόνο είδος φυτού.

Νέκρωση: νεκρός (δηλαδή λευκός ή διαποτισμένος με νερό) θαλλικός ιστός.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων *No Observed Effect Concentration*): η αμέσως μικρότερη από τη LOEC ελεγχόμενη συγκέντρωση.

Φαινότυπος: τα αντιληπτά χαρακτηριστικά ενός οργανισμού, τα οποία καθορίζονται από την αλληλεπίδραση των γονιδίων του με το περιβάλλον του.

Μεταβλητές απόκρισης: μεταβλητές για την εκτίμηση της τοξικότητας, οι οποίες προκύπτουν, με διάφορες μεθόδους υπολογισμού, από τις μετρούμενες μεταβλητές που περιγράφουν τη βιομάζα. Στην παρούσα μέθοδο, ο ρυθμός ανάπτυξης και η απόδοση είναι μεταβλητές απόκρισης που προκύπτουν από μετρούμενες μεταβλητές, όπως ο αριθμός θαλλών, η θαλλική επιφάνεια, το υγρό βάρος ή το ξηρό βάρος.

Ημιστατική δοκιμή (ανανέωσης): η δοκιμή στη διάρκεια της οποίας το διάλυμα δοκιμής αντικαθίσταται σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Στατική δοκιμή: η δοκιμή στη διάρκεια της οποίας δεν ανανεώνεται το διάλυμα δοκιμής.

Τελικό σημείο της δοκιμής: περιγράφει, ως στόχο της δοκιμής, τον γενικό παράγοντα που θα μεταβληθεί υπό την επίδραση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην παρούσα μέθοδο, τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή (παρεμπόδιση) της ανάπτυξης, η οποία μπορεί να εκφραστεί με διάφορες μεταβλητές απόκρισης, βασιζόμενες σε μία ή περισσότερες μετρούμενες μεταβλητές.

Υλικό δοκιμής: το πλήρες συνθετικό θρεπτικό υλικό, στο οποίο αναπτύσσονται τα φυτά της δοκιμής, όταν εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία. Η ελεγχόμενη ουσία είναι κατά κανόνα διαλυμένη στο υλικό δοκιμής.

Απόδοση: ισούται με την τιμή της μετρούμενης μεταβλητής που εκφράζει τη βιομάζα, στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον την τιμή της ίδιας μεταβλητής στην αρχή της περιόδου έκθεσης.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Λογαριθμικές (εκθετικές) καλλιέργειες φυτών του γένους *Lemma* αφήνονται να αναπτυχθούν ως μονοκαλλιέργειες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας για περίοδο επτά ημερών. Σκοπός τη δοκιμής είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιδράσεων της ουσίας στη βλαστητική αύξηση κατά την ανωτέρω περίοδο, με βάση εκτιμήσεις των επιλεγμένων μετρούμενων μεταβλητών. Ο αριθμός θαλλών είναι η πρωταρχική μετρούμενη μεταβλητή. Μετράται επίσης τουλάχιστον μία ακόμη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή ορισμένες ουσίες είναι δυνατόν να έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές απ' όση στον αριθμό θαλλών. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιδράσεων της ουσίας, συγκρίνεται η ανάπτυξη στα διαλύματα δοκιμής με εκείνη των μαρτύρων και προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %), η οποία εκφράζεται ως EC_x (π.χ. EC_{50}).

Το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, εκφραζόμενη ως λογαριθμική αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης) στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Από τους μέσους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης που καταγράφονται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως $E_r C_x$ (π.χ. $E_r C_{50}$).

Μία επιπλέον μεταβλητή απόκριση που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι η απόδοση, η οποία ενδέχεται να απαιτείται για τη συμμόρφωση με ειδικές κανονιστικές απαιτήσεις σε ορισμένες χώρες. Η απόδοση ορίζεται ως η διαφορά των μετρούμενων μεταβλητών στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον τις μετρούμενες μεταβλητές στην αρχή της περιόδου αυτής. Από την απόδοση που καταγράφεται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της απόδοσης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως E_{yC_x} (π.χ. $E_{yC_{50}}$).

Επιπροσθέτως, μπορούν να προσδιοριστούν στατιστικά η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC).

1.4. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Θα πρέπει να υπάρχει αναλυτική μέθοδος επαρκούς ευαισθησίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στο υλικό δοκιμής.

Στις σχετικές με την ελεγχόμενη ουσία πληροφορίες, που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής, περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η υδατοδιαλυτότητα, η σταθερότητα στο νερό και στο φως, οι σταθερές pK_a και P_{ow} , η τάση ατμών και η βιοαποικοδομησιμότητα. Η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της σταθεράς του νόμου του Henry, η οποία δείχνει αν είναι πιθανόν να σημειωθούν σημαντικές απώλειες της ελεγχόμενης ουσίας στη διάρκεια της δοκιμής. Με τον τρόπο αυτό κρίνεται ευκολότερα αν πρέπει να ληφθούν ιδιαίτερα μέτρα για τον έλεγχο των εν λόγω απωλειών. Σε περίπτωση που τα στοιχεία για τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας είναι αβέβια, συνιστάται να εκτιμώνται οι ιδιότητες αυτές στις συνθήκες της δοκιμής, δηλαδή θρεπτικό υλικό και συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.

Όταν ο έλεγχος του pH του υλικού δοκιμής έχει ιδιαίτερη σημασία, π.χ. στις δοκιμές μετάλλων ή ασταθών στην υδρόλυση ουσιών, συνιστάται η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο θρεπτικό υλικό (βλέπε σημείο 1.7.4, πρώτο εδάφιο). Περαιτέρω καθοδήγηση για τον έλεγχο ουσιών που οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες δυσχεραίνουν τη δοκιμή τους παρέχονται στη δημοσίευση (11).

1.5. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Είναι δυνατόν να υποβληθούν σε δοκιμή μία ή περισσότερες ουσίες αναφοράς, όπως η 3,5-διχλωρο-φαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στη διεθνή κυκλική δοκιμή (10), προκειμένου να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής. Είναι σκόπιμο να υποβάλλεται η ουσία αναφοράς σε δοκιμή τουλάχιστον ανά εξάμηνο ή, στην περίπτωση των δοκιμών που διεξάγονται με μικρότερη συχνότητα, παράλληλα με τον προσδιορισμό της τοξικότητας της ελεγχόμενης ουσίας.

1.6. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, ο χρόνος διπλασιασμού του αριθμού θαλλών στον μάρτυρα πρέπει να μην υπερβαίνει τις 2,5 ημέρες (60 ώρες), τιμή που αντιστοιχεί περίπου σε επταπλασιασμό σε επτά ημέρες και σε μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης $0,275$ ημέρα⁻¹. Με τα υλικά και στις συνθήκες δοκιμής που περιγράφονται στη παρούσα μέθοδο, το κριτήριο αυτό είναι δυνατόν να πληρούται σε στατικό σύστημα δοκιμής (8). Προβλέπεται επίσης ότι θα πληρούται σε συνθήκες ημιστατικής και συνεχούς δοκιμής. Ο υπολογισμός του χρόνου διπλασιασμού παρατίθεται στο σημείο 2.1.

1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.7.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

Όλα τα τεμάχια εξοπλισμού που πρόκειται να έλθουν σε επαφή με τα υλικά δοκιμής πρέπει να είναι κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια και δοκιμές θα πρέπει να καθαρίζονται για την απομάκρυνση των ξένων χημικών ουσιών, οι οποίες θα μπορούσαν να διεγείρουν στο υλικό δοκιμής, και να είναι στείρα. Τα δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να έχουν ικανό πλάτος, ώστε οι θαλλοί των διαφόρων αποικιών στα δοχεία μάρτυρες να μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς να αλληλεπικαλύπτονται στο τέλος της δοκιμής. Δεν έχει σημασία αν οι ρίζες αγγίζουν τον πυθμένα των δοκιμαστικών δοχείων, συνιστάται όμως να έχει κάθε δοκιμαστικό δοχείο ελάχιστο βάθος 20 mm και ελάχιστο όγκο 100 ml. Η επιλογή τύπου δοκιμαστικών δοχείων δεν έχει κρίσιμη σημασία, εφόσον πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές. Τα γυάλινα ποτήρια ζέσεως, δοχεία κρυστάλλωσης και τριβλία petri με τις ενδεδειγμένες διαστάσεις έχουν αποδειχθεί όλα κατάλληλα. Τα δοκιμαστικά δοχεία πρέπει να καλύπτονται, ώστε να ελαχιστοποιούνται η εξάτμιση και η συμπτωματική μόλυνση, ταυτόχρονα δε, να είναι δυνατή η αναγκαία ανταλλαγή αέρα. Τα κατάλληλα δοκιμαστικά δοχεία και, ιδίως, τα καλύμματα πρέπει να αποτρέπουν τη σκίαση και τις αλλαγές στα φασματικά χαρακτηριστικά του φωτός.

Οι καλλιέργειες και τα δοκιμαστικά δοχεία δεν θα πρέπει να φυλάσσονται μαζί. Ο καλύτερος τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρήση χωριστών θαλάμων, επωαστήρων ή δωμάτων ανάπτυξης σε συνθήκες περιβάλλοντος. Ο φωτισμός και η θερμοκρασία πρέπει να μπορούν να ρυθμίζονται και να διατηρούνται σταθερά (βλέπε σημείο 1.7.8).

1.7.2. Οργανισμός δοκιμής

Ο οργανισμός που χρησιμοποιείται στην παρούσα δοκιμή είναι είτε το είδος *Lemna gibba* ή το *Lemna minor*. Σύντομες περιγραφές των ειδών λέμνας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές τοξικότητας παρέχονται στο προσάρτημα 1. Το φυτικό υλικό μπορεί να ληφθεί από συλλογή καλλιέργειών, άλλο εργαστήριο ή από το ύπαιθρο. Εάν τα φυτά έχουν συλλεχθεί από το ύπαιθρο, θα πρέπει να διατηρούνται σε καλλιέργεια στο ίδιο θρεπτικό υλικό με εκείνο που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, τουλάχιστον για οκτώ εβδομάδες πριν από τη χρήση τους. Οι υπαίθριοι χώροι από τους οποίους συλλέγονται τα φυτά των αρχικών καλλιεργειών πρέπει να είναι απαλλαγμένοι από εμφανείς πηγές μόλυνσης. Ομοίως, εάν τα φυτά έχουν ληφθεί από άλλο εργαστήριο ή από συλλογή καλλιεργειών, θα πρέπει να διατηρούνται για χρονικό διάστημα τουλάχιστον τριών εβδομάδων. Θα πρέπει πάντα να αναφέρονται η πηγή του φυτικού υλικού, καθώς και το είδος και ο κλώνος (εφόσον είναι γνωστός) που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μονοκαλλιέργειες, εμφανώς απαλλαγμένες από μόλυνση από άλλους οργανισμούς, όπως φύκη (άλγες) και πρωτόζωα. Τα υγιή φυτά του είδους *L. minor* συνίστανται από αποικίες που περιλαμβάνουν δύο έως πέντε θαλλούς, ενώ οι υγιείς αποικίες του *L. gibba* είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν έως επτά θαλλούς.

Η ποιότητα και η ομοιομορφία των φυτών που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή επηρεάζουν σημαντικά την έκβασή της και, συνεπώς, πρέπει να επιλέγονται επιμελώς. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά, ταχέως αναπτυσσόμενα φυτά, χωρίς ορατές αλλοιώσεις ούτε αποχρωματισμό (χλώρωση). Οι καλλιέργειες καλής ποιότητας χαρακτηρίζονται από υψηλή συχνότητα εμφάνισης αποικιών με δύο τουλάχιστον θαλλούς. Ο μεγάλος αριθμός μεμονωμένων θαλλών αποτελεί ένδειξη περιβαλλοντικής πίεσης, π.χ. περιορισμός θρεπτικών στοιχείων, και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή φυτικό υλικό από τέτοιες καλλιέργειες.

1.7.3. Καλλιέργεια

Για λιγότερο συχνή διατήρηση της καλλιέργειας (π.χ. όταν δεν έχουν προγραμματιστεί δοκιμές σε λέμνα για κάποιο διάστημα), οι καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε συνθήκες ελαττωμένου φωτισμού και ελαττωμένης θερμοκρασίας (4-10 °C). Λεπτομέρειες σχετικά με την καλλιέργεια παρέχονται στο προσάρτημα 2. Τα προφανή σημεία μόλυνσης από φύκη ή άλλους οργανισμούς επιβάλλουν την επιφανειακή αποστείρωση ενός μερικού δείγματος θαλλών λέμνας, ακολουθούμενη από μεταφορά σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό (βλέπε προσάρτημα 2). Στην περίπτωση αυτή, η υπόλοιπη μολυσμένη καλλιέργεια θα πρέπει να απορρίπτεται.

Τουλάχιστον επτά ημέρες πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, επαρκής αριθμός αποικιών μεταφέρονται ασηπτικά σε στείρο θρεπτικό υλικό πρόσφατης παρασκευής και καλλιεργούνται για 7-10 ημέρες στις συνθήκες της δοκιμής.

1.7.4. Υλικό δοκιμής

Συνιστώνται διαφορετικά θρεπτικά υλικά για το *Lemna minor* και το *Lemna gibba*, τα οποία περιγράφονται κατωτέρω. Θα πρέπει να μελετάται με προσοχή η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο υλικό δοκιμής (MOPS [4-μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ, αριθ. CAS: 1132-61-2, αριθ. EINECS: 214-478-5] στο υλικό για το *L. minor* και NaHCO₃ στο υλικό για το *L. gibba*), εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι ενδέχεται να αντιδράσει με την ελεγχόμενη ουσία και να επηρεάσει την έκφραση της τοξικότητάς της. Αποδεκτό είναι, επίσης, το υλικό Steinberg (12), εφόσον πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.

Για την καλλιέργεια και τις δοκιμές σε *L. minor* συνιστάται, τροποποιημένο, το πρότυπο θρεπτικό υλικό για λέμνα του Σουηδικού Ινστιτούτου Προτύπων (SIS). Η σύσταση του υλικού αυτού παρατίθεται στο προσάρτημα 3.

Για την καλλιέργεια και τις δοκιμές σε *L. gibba* συνιστάται το θρεπτικό υλικό 20X — AAP που περιγράφεται στο προσάρτημα 3.

Κατάλληλο για το είδος *L. minor* είναι, επίσης, το περιγραφόμενο στο προσάρτημα 3 υλικό Steinberg, το οποίο, ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το *L. gibba*, εφόσον πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.

1.7.5. Διαλύματα δοκιμής

Τα διαλύματα δοκιμής παρασκευάζονται συνήθως με αραιώση μητρικών διαλυμάτων. Τα μητρικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας παρασκευάζονται, κατά κανόνα, με διάλυση της ουσίας στο θρεπτικό υλικό.

Η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής της ελεγχόμενης ουσίας θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει την υδατοδιαλυτότητα της στις συνθήκες της δοκιμής. Σημειώτεον, όμως, ότι τα φυτά *Lemna spp.* επιπλέον στην επιφάνεια και είναι δυνατόν να εκτεθούν σε ουσίες που συσσωρεύονται στην επιφάνεια επαφής νερού-αέρα (π.χ. δυσδιάλυτες στο νερό ή υδρόφοβες ή επιφανειοδραστικές ουσίες). Στις περιπτώσεις αυτές, η έκθεση οφείλεται σε άλλες ύλες πλιν των διαλυμένων, οι δε συγκεντρώσεις δοκιμής μπορούν να υπερβαίνουν την υδατοδιαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της. Προκειμένου για ελεγχόμενες ουσίες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να παρασκευαστεί πυκνό μητρικό ή κολλοειδές διάλυμα της ουσίας με τη βοήθεια οργανικού διαλύτη ή μέσου διασποράς, ώστε να διευκολυνθεί η προσθήκη ακριβών ποσοτήτων της ελεγχόμενης ουσίας στο υλικό δοκιμής και να υποβοηθηθούν

διασπορά και η διάλυση της. Θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για τη αποφυγή της χρήσης τέτοιων υλικών. Η χρήση βοηθητικών διαλυτών ή μέσων διασποράς δεν θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα φυτοτοξικότητα. Για παράδειγμα, μεταξύ των διαλυτών ευρείας χρήσης που δεν προκαλούν φυτοτοξικότητα σε συγκεντρώσεις έως 100 μl^{-1} περιλαμβάνονται η ακετόνη και το διμεθυλοφορμαμίδιο. Σε περίπτωση χρήσης διαλύτη ή μέσου διασποράς, η τελική του συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται και να διατηρείται σε ελάχιστα επίπεδα ($\leq 100 \text{ μl}^{-1}$), να είναι δε η ίδια σε όλες τις ομάδες αγωγής και μάρτυρες. Περαιτέρω καθοδήγηση για τη χρήση μέσων διασποράς παρέχεται στη δημοσίευση (11).

1.7.6. Ομάδες δοκιμής και μάρτυρες

Η προηγούμενη γνώση της τοξικότητας της ελεγχόμενης ουσίας για τη λέμνα, π.χ. μέσω δοκιμής εύρεσης πεδίου τιμών, διευκολύνει την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής. Στην οριστική δοκιμή τοξικότητας, θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής, διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο. Ο λόγος πρόδου θα πρέπει, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 3,2, αλλά επιτρέπεται να χρησιμοποιείται υψηλότερη τιμή, εάν η καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης είναι επίπεδη. Εάν έχουν χρησιμοποιηθεί λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία πανομοιότυπα δοχεία (replicates).

Στον καθορισμό της σειράς των συγκεντρώσεων δοκιμής (για τη δοκιμή εύρεσης πεδίου τιμών ή/και τη οριστική δοκιμή τοξικότητας), θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

- Για τον προσδιορισμό μιας $EC_{x\%}$, η τιμή της θα πρέπει να περικλείεται από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, ώστε να εξασφαλίζεται η ενδεδειγμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Εάν, λόγω χάριν, πρόκειται να εκτιμηθεί η $EC_{50\%}$, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή $EC_{50\%}$. Εάν η τιμή $EC_{50\%}$ βρίσκεται εκτός του εύρους των συγκεντρώσεων δοκιμής, τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης θα είναι μεγάλα, με αποτέλεσμα να καθίσταται ενδεχομένως αδύνατη η ορθή αξιολόγηση της στατιστικής προσαρμογής με το μοντέλο.
- Εάν το ζητούμενο είναι η εκτίμηση της LOEC/NOEC, η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, ώστε η ανάπτυξη να μην είναι σημαντικά μικρότερη απ' ό,τι στον μάρτυρα. Επιπλέον, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως υψηλή, ώστε η ανάπτυξη να είναι σημαντικά μικρότερη απ' ό,τι στον μάρτυρα. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμή θα πρέπει να επαναληφθεί με διαφορετικό εύρος συγκεντρώσεων (εκτός εάν η υψηλότερη συγκέντρωση δεν υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας ή το απαιτούμενο ανώτατο όριο συγκέντρωσης, π.χ. $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

Κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει μάρτυρες, που συνίστανται σε θρεπτικό υλικό, αριθμό θαλλών και αποικιών, συνθήκες περιβάλλοντος και διαδικασίες ίδια με εκείνα των δοχείων αγωγής, αλλά χωρίς την ελεγχόμενη ουσία. Εάν χρησιμοποιείται βοηθητικός διαλύτης ή μέσο διασποράς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πρόσθετη αγωγή μάρτυρας με τον διαλύτη/μέσο διασποράς στην ίδια συγκέντρωση με τη χρησιμοποιούμενη στα δοχεία που περιέχουν την ελεγχόμενη ουσία. Το πλήθος των δοχείων μαρτύρων (και των δοχείων με διαλύτη, εάν έχει εφαρμογή) πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσο και, στην ιδανική περίπτωση, διπλάσιο από το πλήθος των δοχείων που χρησιμοποιούνται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής.

Εάν δεν απαιτείται προσδιορισμός της NOEC, ο σχεδιασμός της δοκιμής είναι δυνατόν να τροποποιηθεί, ώστε να αυξηθεί το πλήθος των συγκεντρώσεων και να μειωθεί το πλήθος των δοχείων ανά συγκέντρωση. Ωστόσο, τα δοχεία μάρτυρες πρέπει να είναι τουλάχιστον τρία.

1.7.7. Έκθεση

Αποικίες αποτελούμενες από 2 έως 4 ορατούς θαλλούς μεταφέρονται ασηπτικά από την καλλιέργεια εμβολιασμού (ενοφθαλμισμού) στα δοκιμαστικά δοχεία με τυχαίοποιημένη κατανομή μεταξύ των δοχείων. Κάθε δοκιμαστικό δοχείο θα πρέπει να περιέχει συνολικά 9 έως 12 fronds. Ο αριθμός των θαλλών και αποικιών θα πρέπει να είναι ο ίδιος σε όλα τα δοχεία. Η εμπειρία από την παρούσα μέθοδο, καθώς και τα δεδομένα κυκλικής δοκιμής δείχνουν ότι ο τριπλός προσδιορισμός ανά αγωγή, κατά τον οποίο κάθε δοχείο περιέχει αρχικά 9 έως 12 θαλλούς, αρκεί για την ανίχνευση διαφορών στην ανάπτυξη της τάξεως του 4 έως 7 %, όταν η αναστολή της υπολογίζεται με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης (10 έως 15 %, όταν υπολογίζεται με βάση την απόδοση) μεταξύ των ομάδων αγωγής (10).

Απαιτείται τυχαίοποιημένος σχεδιασμός για τη θέση των δοκιμαστικών δοχείων στον επωαστήρα, ώστε να ελαχιστοποιείται η επήρροη των χωρικών διαφορών ως προς τη φωτεινή ένταση ή τη θερμοκρασία. Απαιτείται επίσης σχεδιασμός καθ' ομάδες (blocked design) ή τυχαίοποιημένη επανατοποθέτηση των δοχείων μετά τις παρατηρήσεις (ή συχνότερη αλλαγή θέσης).

Εάν από προκαταρκτική δοκιμή σταθερότητας έχει προκύψει ότι δεν είναι δυνατόν να διατηρηθεί η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας (δηλαδή η μετρούμενη συγκέντρωση μειώνεται κάτω του 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής (7 ημέρες), συνιστάται ημιστατικό σύστημα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, οι αποικίες θα πρέπει να εκτίθενται σε πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής και μάρτυρα τουλάχιστον δύο φορές κατά τη δοκιμή (π.χ. την 3^η και την 5^η ημέρα). Η συχνότητα έκθεσης στο πρόσφατα παρασκευασμένο υλικό εξαρτάται από τη σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας· ενδέχεται να χρειαστεί μεγαλύτερη συχνότητα για τη διατήρηση σχεδόν σταθερών συγκεντρώσεων εξαιρετικά ασταθών ή πτητικών ουσιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτηθεί συνεχής διαδικασία (11)(13).

Το σενάριο έκθεσης μέσω εφαρμογής στο φύλλωμα (ψεκασμός) δεν καλύπτεται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών, βλέπε αντ' αυτής δημοσίευση (14).

1.7.8. Συνθήκες επώασης

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται συνεχής φωτισμός με θερμό ή ψυχρό λευκό φως φθορισμού, ώστε να εξασφαλίζεται φωτεινή ένταση η οποία επιλέγεται από το πεδίο τιμών $85-135 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (ισοδύναμο με 6 500-10 000 lux), μετρούμενη σε φωτοσυνθετικά ενεργό μήκος κύματος της ακτινοβολίας (400-700 nm), σε σημεία που βρίσκονται στην ίδια απόσταση από τη φωτεινή πηγή όπως οι θαλλοί της λέμνας. Οι τυχόν διαφορές από την επιλεγμένη φωτεινή ένταση στην επιφάνεια όπου διεξάγεται η δοκιμή δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το $\pm 15\%$. Η μέθοδος ανίχνευσης και μέτρησης του φωτός, ιδίως δε ο τύπος του αισθητήρα, επηρεάζουν τη μετρούμενη τιμή. Οι σφαιρικοί αισθητήρες (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω και κάτω από το επίπεδο μέτρησης) και οι αισθητήρες συνημμένου (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω από το επίπεδο μέτρησης) προτιμώνται έναντι των αισθητήρων μονής κατεύθυνσης και παρέχουν μεγαλύτερες ενδείξεις για τις πολυσημειακές φωτεινές πηγές του είδους που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο.

Η θερμοκρασία στα δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να είναι $24 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. Το pH του υλικού μάρτυρα δεν θα πρέπει να αυξάνεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδα στη διάρκεια της δοκιμής. Ωστόσο, οι αποκλίσεις πέραν της 1,5 μονάδας δεν ακυρώνουν τη δοκιμή, εφόσον είναι δυνατόν να αποδειχθεί ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας της. Πρέπει να αποδίδεται μεγαλύτερη προσοχή στη μεταβολή του pH σε ειδικές περιπτώσεις, όπως κατά τη δοκιμή ασταθών ουσιών ή μετάλλων. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στη δημοσίευση (11).

1.7.9. Διάρκεια

Η δοκιμή τερματίζεται 7 ημέρες μετά τη μεταφορά των φυτών στα δοκιμαστικά δοχεία.

1.7.10. Μετρήσεις και αναλυτικοί προσδιορισμοί

Στην αρχή της δοκιμής μετράται και καταγράφεται ο αριθμός θαλλών, με μέριμνα ώστε να καταμετρώνται οι προεξέχοντες ευδιάκριτοι θαλλοί. Οι αριθμοί θαλλών που φαίνονται φυσιολογικοί ή αφύσικοι πρέπει να προσδιορίζονται στην αρχή της δοκιμής, τουλάχιστον ανά τρεις ημέρες κατά την περίοδο έκθεσης (δηλαδή τουλάχιστον δύο φορές στη διάρκεια της επταήμερης περιόδου) και τουλάχιστον στο τέλος της δοκιμής. Οι αλλαγές στην ανάπτυξη των φυτών, π.χ. μεταβολή του μεγέθους και της εμφάνισης των θαλλών, ενδείξεις νέκρωσης, χλώρωσης ή κυφότητας, θραύση ή απώλεια πλευστότητας των αποικιών, καθώς και στο μήκος και στην όψη των ριζών πρέπει να σημειώνονται. Θα πρέπει επίσης να σημειώνονται τα σημαντικά χαρακτηριστικά του υλικού δοκιμής (π.χ. παρουσία αδιάλυτων υλικών, ανάπτυξη φυκών στο δοκιμαστικό δοχείο).

Επιπλέον της καταμέτρησης των θαλλών κατά τη δοκιμή, εκτιμώνται οι επιδράσεις της ελεγχόμενης ουσίας και σε μία (ή περισσότερες) από τις ακόλουθες μετρούμενες μεταβλητές:

- i) συνολική θαλλική επιφάνεια,
- ii) ξηρό βάρος,
- iii) υγρό βάρος.

Η συνολική θαλλική επιφάνεια παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να προσδιοριστεί σε κάθε δοχείο δοκιμής και μάρτυρα στην αρχή, στη διάρκεια και στο τέλος της δοκιμής. Το ξηρό ή το υγρό βάρος θα πρέπει να προσδιορίζεται στη αρχή της δοκιμής, σε δείγμα της καλλιέργειας εμβολιασμού το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό του υλικού που χρησιμοποιήθηκε για την εκκίνηση της δοκιμής, καθώς και στο τέλος της δοκιμής στο φυτικό υλικό κάθε δοχείου δοκιμής και μάρτυρα. Εάν δεν μετράται η θαλλική επιφάνεια, προτιμάται το ξηρό βάρος έναντι του υγρού.

Η συνολική θαλλική επιφάνεια, το ξηρό βάρος και το υγρό βάρος μπορούν να προσδιοριστούν ως εξής:

- i) **Συνολική θαλλική επιφάνεια:** Η συνολική επιφάνεια των θαλλών όλων των αποικιών μπορεί να προσδιοριστεί με ανάλυση εικόνων. Είναι δυνατόν να αποτυπωθεί το περιγράμμα του δοκιμαστικού δοχείου και των φυτών με βιντεοκάμερα (δηλαδή με τοποθέτηση του δοχείου σε φωτοτράπεζα) και να ψηφιοποιηθεί η προκύπτουσα εικόνα. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται η συνολική θαλλική επιφάνεια σε ένα δοκιμαστικό δοχείο με βαθμονόμηση με επίπεδα σχήματα γνωστού εμβαδού. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για τον αποκλεισμό των παρεμβολών που οφείλονται στο χείλος του δοχείου. Εναλλακτική, αλλά πιο επίπονη προσέγγιση είναι η λήψη φωτοτυπιών των δοκιμαστικών δοχείων και των φυτών, η αποκοπή του προκύπτοντος περιγράμματος των αποικιών και ο προσδιορισμός της επιφάνειάς τους με αναλυτή φυλλικής επιφάνειας ή χαρτί γραφημάτων. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες τεχνικές (π.χ. αναλογία βάρους χαρτιού μεταξύ της επιφάνειας του περιγράμματος των αποικιών και της μοναδιαίας επιφάνειας).
- ii) **Ξηρό βάρος:** Από κάθε δοκιμαστικό δοχείο συλλέγονται όλες οι αποικίες και εκπλύνονται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Στυπώνονται για την απομάκρυνση της περίσσειας νερού και, κατόπιν, ξηραίνονται στους 60 °C μέχρι σταθερού βάρους. Τα ενδεχόμενα θραύσματα ριζών θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται. Το ξηρό βάρος θα πρέπει να εκφράζεται με ακρίβεια τουλάχιστον 0,1 mg.
- iii) **Υγρό βάρος:** Όλες οι αποικίες μεταφέρονται σε προξυγισμένους σωλήνες κατασκευασμένους από πολυστυρόλιο (ή άλλο αδρανές υλικό), με στρογγυλό πυθμένα που φέρει μικρές οπές (1 mm). Στη συνέχεια, οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται στις 3 000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι σωλήνες, που περιέχουν τις στεγνές πλέον αποικίες, επαναυγίζονται και υπολογίζεται το υγρό βάρος με αφαίρεση του βάρους του κενού σωλήνα.

1.7.10.1. Συχνότητα των μετρήσεων και αναλυτικών προσδιορισμών

Εάν εφαρμόζεται σχεδιασμός στατικής δοκιμής, θα πρέπει να μετράται το pH κάθε αγωγής στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Εάν εφαρμόζεται σχεδιασμός ημιστατικής δοκιμής, το pH θα πρέπει να μετράται σε κάθε παρτίδα «πρόσφατου» διαλύματος δοκιμής, πριν από κάθε ανανέωση, καθώς και στα αντίστοιχα «εξαντλημένα» διαλύματα.

Η φωτεινή ένταση θα πρέπει να μετράται στον θάλαμο, επωαστήρα ή δωμάτιο ανάπτυξης, σε σημεία που βρίσκονται στην ίδια απόσταση από τη φωτεινή πηγή όπως οι θαλλοί της λέμνας. Οι μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον μία φορά στη διάρκεια της δοκιμής. Θα πρέπει να καταγράφεται, τουλάχιστον ημερησίως, η θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού σε υποκατάστατο δοχείο, το οποίο διατηρείται στις ίδιες συνθήκες στον θάλαμο, επωαστήρα ή δωμάτιο ανάπτυξης.

Στη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας προσδιορίζονται σε κατάλληλα διαστήματα. Η ελάχιστη απαίτηση για τις στατικές δοκιμές είναι ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

Στις ημιστατικές δοκιμές, κατά τις οποίες η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας αναμένεται να μην παραμείνει εντός των ορίων της ονομαστικής συγκέντρωσης $\pm 20\%$, είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε ανάλυση όλα τα πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής, καθώς και τα ίδια διαλύματα σε κάθε ανανέωση (βλέπε σημείο 1.7.7, τρίτο εδάφιο). Ωστόσο, στην περίπτωση των δοκιμών κατά τις οποίες η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας διαφέρει περισσότερο από $\pm 20\%$ από την ονομαστική συγκέντρωση, αλλά μπορούν να προσκομιστούν επαρκή στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι επαναληψίμες και σταθερές (δηλαδή κυμαίνονται μεταξύ 80 και 120 % της αρχικής συγκέντρωσης), είναι δυνατόν να εκτελείται χημικός προσδιορισμός μόνο για την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής. Σε κάθε περίπτωση, οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας πριν από την ανανέωση είναι αναγκαίο να προσδιορίζονται μόνο σε ένα από τα πολλαπλά δοχεία για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ή στο συνενωμένο περιεχόμενο των δοχείων ανά πολλαπλό προσδιορισμό).

Εάν χρησιμοποιείται συνεχής δοκιμή, ενδείκνυται σύστημα δειγματοληψίας ανάλογο με το περιγραφόμενο για τις ημιστατικές δοκιμές, το οποίο περιλαμβάνει ανάλυση στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της δοκιμής, χωρίς όμως μετρήσεις στα «εξαντλημένα» διαλύματα, που δεν ενδείκνυται εν προκειμένω. Στον συγκεκριμένο τύπο δοκιμής, θα πρέπει να ελέγχεται ημερησίως η ταχύτητα ροής του μέσου αραίωσης και της ελεγχόμενης ουσίας ή του μητρικού διαλύματος της ελεγχόμενης ουσίας.

Εάν υπάρχουν στοιχεία, από τα οποία προκύπτει ότι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά εντός των ορίων της ονομαστικής ή της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης $\pm 20\%$ σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να βασιστεί στις ονομαστικές ή τις μετρηθείσες αρχικές τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή τη μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση υπερβαίνει το $\pm 20\%$, η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να βασίζεται στον γεωμετρικό μέσο όρο των συγκεντρώσεων κατά την έκθεση ή σε μοντέλα που περιγράφουν τη μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας (11).

1.7.11. **Οριακή δοκιμή**

Σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν από προκαταρκτική δοκιμή έχει προκύψει ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε συγκεντρώσεις έως $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ή έως το όριο διαλυτότητάς της στο υλικό της δοκιμής (αναλόγως του ποια είναι μικρότερη), είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή, η οποία συνίσταται σε σύγκριση των αποκρίσεων μίας ομάδας μάρτυρα και μίας ομάδας αγωγής (συγκέντρωση ίση με $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ή με το όριο διαλυτότητας). Συνιστάται ένθερμα να τεκμηριώνεται αυτό με ανάλυση της συγκέντρωσης έκθεσης. Η οριακή δοκιμή υπόκειται σε όλες τις συνθήκες δοκιμής και όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται ανωτέρω, εξαιρουμένου του πλήθους των δοχείων αγωγής, που θα πρέπει να είναι τουλάχιστον διπλάσιο. Η ανάπτυξη στην ομάδα μάρτυρα και στην ομάδα αγωγής είναι δυνατόν να υποβληθεί σε στατιστική ανάλυση με δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων, π.χ. δοκιμή t του Student.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**2.1. **ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ**

Για τον προσδιορισμό του χρόνου διπλασιασμού (T_d) του αριθμού θαλλών και την τήρηση αυτού του κριτηρίου εγκυρότητας στη μελέτη (σημείο 1.6), εφαρμόζεται ο ακόλουθος τύπος στα δεδομένα που προκύπτουν από τα δοχεία μάρτυρες:

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

όπου μ είναι ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, ο οποίος προσδιορίζεται όπως περιγράφεται στο σημείο 2.2.1, πρώτο και δεύτερο εδάφιο.

2.2. **ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ**

Η δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό των επιδράσεων της ελεγχόμενης ουσίας στη βλαστική ανάπτυξη της λέμνας. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφονται δύο μεταβλητές απόκρισης, δεδομένου ότι τα κράτη μέλη έχουν διαφορετικές προτιμήσεις και κανονιστικές ανάγκες. Για να είναι τα αποτελέσματα των δοκιμών αποδεκτά σε όλα τα κράτη μέλη, οι επιδράσεις θα πρέπει να αξιολογούνται με χρήση και των δύο μεταβλητών απόκρισης α) και β) που περιγράφονται κατωτέρω.

- α) Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: αυτή η μεταβλητή απόκριση υπολογίζεται με βάση τις μεταβολές του λογάριθμου του αριθμού θαλλών και, επιπλέον, τις μεταβολές του λογάριθμου μίας δεύτερης μετρούμενης παραμέτρου (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) με την πάροδο του χρόνου (εκφραζόμενες ανά ημέρα) στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα αγωγής. Η εν λόγω μεταβλητή αναφέρεται μερικές φορές ως σχετικός ρυθμός ανάπτυξης (15).
- β) Απόδοση: αυτή η μεταβλητή απόκριση υπολογίζεται με βάση τις μεταβολές του αριθμού θαλλών και, επιπλέον, τις μεταβολές μίας δεύτερης μετρούμενης παραμέτρου (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα αγωγής μέχρι το τέλος της δοκιμής.

Σημειωτέον ότι οι τιμές τοξικότητας που υπολογίζονται με χρήση των ανωτέρω δύο μεταβλητών απόκρισης δεν είναι συγκρίσιμες και η διαφορά αυτή πρέπει να αναγνωρίζεται, όταν χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της δοκιμής. Εφόσον τηρούνται οι συνθήκες δοκιμής που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, οι τιμές EC_x που προκύπτουν από τον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (E_yC_x) είναι γενικά υψηλότερες από τα βασιζόμενα στην απόδοση αποτελέσματα (E_yC_x), λόγω της μαθηματικής βάσης της αντίστοιχης προσέγγισης. Αυτό δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως διαφορά ευαισθησίας μεταξύ των δύο μεταβλητών απόκρισης: πρόκειται απλώς για μαθηματική διαφορά τιμών. Η έννοια του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης βασίζεται στον γενικό λογαριθμικό τύπο ανάπτυξης της λέμνας σε απεριόριστες καλλιέργειες, όπου η τοξικότητα εκτιμάται με βάση τις επιδράσεις στον ρυθμό ανάπτυξης, χωρίς να εξαρτάται από την απόλυτη τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μάρτυρα ούτε από την κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης ούτε από τη διάρκεια της δοκιμής. Αντίθετα, τα αποτελέσματα που βασίζονται στην απόδοση ως μεταβλητή απόκρισης εξαρτώνται από όλες τις προαναφερόμενες άλλες μεταβλητές. Η E_yC_x εξαρτάται από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών κλώνων. Η συγκεκριμένη μεταβλητή απόκρισης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη σύγκριση της ευαισθησίας διαφορετικών ειδών ή κλώνων λέμνας σε τοξικούς παράγοντες. Μολονότι είναι προτιμότερο, από επιστημονική άποψη, να χρησιμοποιείται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την εκτίμηση της τοξικότητας, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει και εκτιμήσεις της τοξικότητας με βάση την απόδοση, προκειμένου να καλυφθούν οι κανονιστικές απαιτήσεις που ισχύουν σήμερα σε ορισμένες χώρες.

Οι εκτιμήσεις της τοξικότητας θα πρέπει να βασίζονται στον αριθμό θαλλών και σε μία πρόσθετη μετρούμενη παράμετρο (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή ορισμένες ουσίες ενδέχεται να έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές απ' όση στον αριθμό θαλλών. Η επίδραση αυτή δεν ανιχνεύεται με τον υπολογισμό μόνο του αριθμού θαλλών.

Ο αριθμός θαλλών και κάθε άλλη μετρούμενη μεταβλητή που έχει καταγραφεί, δηλαδή συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος, καταχωρίζονται σε πίνακα μαζί με τις συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας για κάθε χρόνο μέτρησης. Η μετέπειτα ανάλυση δεδομένων, π.χ. για την εκτίμηση της LOEC, NOEC ή EC₅₀, θα πρέπει να βασίζεται στις τιμές που αντιστοιχούν σε καθένα από τα πολλαπλά δοχεία αγωγής και όχι σε μέσες τιμές που έχουν υπολογιστεί για κάθε ομάδα αγωγής.

2.2.1. Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

Ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για συγκεκριμένη χρονική περίοδο υπολογίζεται ως η λογαριθμική αύξηση των μεταβλητών ανάπτυξης — αριθμός θαλλών και μία ακόμη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) — από τον ακόλουθο τύπο, ο οποίος εφαρμόζεται σε καθένα από τα πολλαπλά δοχεία μάρτυρες και αγωγής:

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

όπου:

- μ_{i-j} : μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα i έως j
- N_i : η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή μάρτυρα κατά τη χρονική στιγμή i
- N_j : η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή μάρτυρα κατά τη χρονική στιγμή j
- t : το χρονικό διάστημα i έως j .

Για κάθε ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης.

Θα πρέπει να υπολογίζεται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για τη συνολική διάρκεια της δοκιμής (η χρονική στιγμή « i » στον ανωτέρω τύπο είναι η αρχή της δοκιμής και η χρονική στιγμή « j » το τέλος της). Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και κάθε μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης. Επιπλέον, θα πρέπει να υπολογίζεται ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης με σκοπό την αξιολόγηση των επιδράσεων της ελεγχόμενης ουσίας στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης (π.χ. με εξέταση των λογαριθμικά μετασχηματισμένων καμπυλών ανάπτυξης). Ουσιαστικές διαφορές μεταξύ του τμηματικού και του μέσου ρυθμού ανάπτυξης υποδηλώνουν απόκλιση από τη σταθερή εκθετική ανάπτυξη και δικαιολογούν την ενδελεχή εξέταση των καμπυλών ανάπτυξης. Μια συντηρητική προσέγγιση στην περίπτωση αυτή είναι η σύγκριση των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα μέγιστης αναστολής μεταξύ των καλλιεργειών που έχουν υποβληθεί σε αγωγή και των μαρτύρων.

Στη συνέχεια, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης (I_r) για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ομάδα αγωγής) από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

- $\%I_r$: εκατοστιαία αναστολή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης
- μ_c : μέση τιμή του μ στον μάρτυρα
- μ_T : μέση τιμή του μ στην ομάδα αγωγής

2.2.2. Απόδοση

Οι επιδράσεις στην απόδοση προσδιορίζονται με βάση τις δύο μετρούμενες μεταβλητές — αριθμός θαλλών και μία ακόμη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) — των οποίων η παρουσία διαπιστώνεται σε κάθε δοκιμαστικό δοχείο στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Στην περίπτωση του ξηρού ή υγρού βάρους, η αρχική βιομάζα προσδιορίζεται σε δείγμα θαλλών λαμβανόμενο από την παρτίδα που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των δοκιμαστικών δοχείων (βλέπε σημείο 1.7.3, δεύτερο εδάφιο). Για κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση

και κάθε μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή της απόδοσης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης. Η εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης (%I_y) μπορεί να υπολογιστεί για κάθε ομάδα αγωγής με τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

- % I_y: εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης
- b_c: τελική βιομάζα μείον αρχική βιομάζα στην ομάδα μάρτυρα
- b_T: τελική βιομάζα μείον αρχική βιομάζα στην ομάδα αγωγής

2.2.3. Χάραξη των καμπυλών συγκέντρωσης-απόκρισης

Θα πρέπει να χαράσσονται καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης, που συνδέουν τη μέση τιμή της εκατοστιαίας αναστολής της μεταβλητής απόκρισης (I_r ή I_y), υπολογιζόμενη όπως υποδεικνύεται στο τελευταίο εδάφιο του σημείου 2.2.1 ή 2.2.2, αντίστοιχα) με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας.

2.2.4. Εκτίμηση της EC_x

Οι εκτιμήσεις της EC_x (π.χ. EC₅₀) θα πρέπει να βασίζονται τόσο στον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (E_rC_x), όσο και στην απόδοση (E_yC_x). Καθεμία από τις μεταβλητές αυτές θα πρέπει να βασίζεται στον αριθμό θαλλών και σε μία πρόσθετη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή υπάρχουν ελεγχόμενες ουσίες με διαφορετική επίδραση στον αριθμό θαλλών απ' ό,τι σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές. Επομένως, οι επιθυμητές παράμετροι τοξικότητας είναι τέσσερις τιμές EC_x για κάθε βαθμό αναστολής x που έχει υπολογιστεί: E_rC_x (αριθμός θαλλών), E_rC_x (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), E_yC_x (αριθμός θαλλών) και E_yC_x (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος).

2.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Το ζητούμενο είναι να ληφθεί ποσοτική σχέση συγκέντρωσης-επίδοσης με ανάλυση παλινδρόμησης. Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, μετά από γραμμικό μετασχηματισμό των δεδομένων απόκρισης, λόγου χάριν, σε μονάδες probit ή logit ή Weibull (16), αλλά προτιμώνται οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, με τις οποίες αντιμετωπίζονται καλύτερα οι αναπόφευκτες ανωμαλίες των δεδομένων και οι αποκλίσεις τους από τις ομαλές κατανομές. Στις περιοχές είτε της μηδενικής είτε της πλήρους αναστολής, οι ανωμαλίες αυτές ενδέχεται να μεγεθυνθούν από τον μετασχηματισμό και να παρεμποδίσουν την ανάλυση (16). Σημειώτεον ότι οι συνήθεις μέθοδοι ανάλυσης με χρήση αποτελεσμάτων μετασχηματισμού probit, logit ή Weibull προορίζονται για δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (π.χ. θνησιμότητα ή επιβίωση) και πρέπει να τροποποιούνται για να καλύψουν δεδομένα ανάπτυξης ή βιομάζας. Ειδικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό τιμών EC_x από συνεχή δεδομένα παρατίθενται στις δημοσιεύσεις (17) (18) και (19).

Για κάθε μεταβλητή απόκρισης που πρόκειται να αναλυθεί, χρησιμοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης για την εκτίμηση των σημείων των τιμών EC_x. Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να προσδιορίζονται, για κάθε εκτίμηση, τα όρια εμπιστοσύνης 95 %. Η καλή προσαρμογή των δεδομένων απόκρισης στο μοντέλο παλινδρόμησης θα πρέπει να αξιολογείται με γραφική ή στατιστική μέθοδο. Η ανάλυση παλινδρόμησης θα πρέπει να εκτελείται με χρήση των αποκρίσεων στα επιμέρους δοχεία και όχι των μέσων όρων των ομάδων αγωγής.

Εάν τα διαθέσιμα μοντέλα/μέθοδοι παλινδρόμησης είναι ακατάλληλα για τα δεδομένα, μπορούν επίσης να ληφθούν εκτιμήσεις και όρια εμπιστοσύνης για την EC₅₀ με γραμμική παρεμβολή με τεχνική εύρεσης εκτιμητριών bootstrap (20).

Για την εκτίμηση της LOEC και, κατ' επέκταση, της NOEC, είναι αναγκαία η σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων αγωγής με τεχνικές ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA). Στη συνέχεια, ο μέσος όρος για κάθε συγκέντρωση πρέπει να συγκρίνεται με τον μέσο όρο του μάρτυρα με κατάλληλη μέθοδο πολλαπλής σύγκρισης ή δοκιμής τάσης. Χρήσιμη για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η δοκιμή του Dunnett ή του Williams (21) (22) (23) (24). Είναι απαραίτητο να κρίνεται αν ευσταθεί η παραδοχή της ANOVA για ομοιογενή διακύμανση. Η αξιολόγηση αυτή μπορεί να διενεργηθεί γραφικά ή με επίσημη δοκιμή (25). Κατάλληλες σχετικές δοκιμές είναι εκείνες του Levene και του Bartlett. Εάν δεν ισχύει η παραδοχή της ομοιογένειας της διακύμανσης, αυτό είναι μερικές φορές δυνατόν να διορθωθεί με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Στις περιπτώσεις ακραίας ετερογένειας της διακύμανσης, η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί με μετασχηματισμό, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης με μεθόδους όπως οι μειωτικές δοκιμές τάσης Jonkheere. Πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με τον προσδιορισμό της NOEC παρέχεται στη δημοσίευση (19).

Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις υπαγόρευσαν τη σύσταση να εγκαταλειφθεί η έννοια της NOEC και να αντικατασταθεί από εκτιμήσεις των σημείων των τιμών EC_x βάσει παλινδρόμησης. Δεν έχει καθοριστεί κατάλληλη τιμή του x για την παρούσα δοκιμή σε λέμνα. Φαίνεται, ωστόσο, να ενδείκνυται ένα εύρος 10 έως 20 % (ανάλογα με την επιλεγμένη μεταβλητή απόκρισης), κατά προτίμηση μάλιστα, να πρέπει να αναφέρονται τόσο η EC_{10} , όσο και η EC_{20} .

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

- φυσική υπόσταση και φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του ορίου υδατοδιαλυτότητας,
- δεδομένα χημικής ταυτοποίησης (π.χ. αριθ. CAS), συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας.

Είδος οργανισμού δοκιμής:

- επιστημονική ονομασία, κλώνος (εάν είναι γνωστός) και πηγή.

Συνθήκες δοκιμής:

- εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (στατική, ημιστατική ή συνεχής),
- ημερομηνία έναρξης και διάρκεια της δοκιμής,
- υλικό δοκιμής,
- περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού: δοκιμαστικά δοχεία και καλύμματα, όγκοι διαλυμάτων, αριθμός αποικιών και θαλλών ανά δοκιμαστικό δοχείο στην αρχή της δοκιμής,
- συγκεντρώσεις δοκιμής (ονομαστικές και μετρηθείσες, κατά περίπτωση) και πλήθος δοχείων (replicates) ανά συκέντρωση,
- μέθοδοι παρασκευής των μητρικών διαλυμάτων και των διαλυμάτων δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης της ενδεχόμενης χρήσης διαλυτών ή μέσων διασποράς,
- θερμοκρασία κατά τη δοκιμή,
- πηγή, ένταση και ομοιογένεια του φωτός,
- τιμές pH των υλικών δοκιμής και μάρτυρα,
- συγκεντρώσεις και μέθοδος ανάλυσης της ελεγχόμενης ουσίας, με τα κατάλληλα δεδομένα αξιολόγησης της ποιότητας (μελέτες επικύρωσης, τυπικές αποκλίσεις ή όρια εμπιστοσύνης των αναλύσεων),
- μέθοδοι προσδιορισμού του αριθμού θαλλών και των τιμών άλλων μετρούμενων μεταβλητών, π.χ. ξηρό βάρος, υγρό βάρος ή θαλλική επιφάνεια,
- όλες οι παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Αποτελέσματα:

- ανεπεξέργαστα δεδομένα: αριθμός θαλλών και τιμές άλλων μετρούμενων μεταβλητών για κάθε δοκιμαστικό δοχείο και μάρτυρα σε κάθε παρατήρηση και χρόνο ανάλυσης,
- μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις για κάθε μετρούμενη μεταβλητή,
- καμπύλες ανάπτυξης για κάθε συκέντρωση (συνιστάται να χαράσσονται με λογαριθμικό μετασχηματισμό των μετρούμενων μεταβλητών, βλέπε σημείο 2.2.1, δεύτερο εδάφιο),
- χρόνος διπλασιασμού/ρυθμός ανάπτυξης στον μάρτυρα, με βάση τον αριθμό θαλλών,

- υπολογισθείσες μεταβλητές απόκρισης για καθένα από τα πολλαπλά δοχεία αγωγής, συνοδευόμενες από τους μέσους όρους και τον συντελεστή μεταβολής για τους πολλαπλούς προσδιορισμούς,
- γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης,
- εκτιμήσεις των τελικών σημείων τοξικότητας για τις μεταβλητές απόκρισης, π.χ. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀ και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές LOEC and NOEC, εφόσον έχουν υπολογιστεί, και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό αυτό,
- εάν έχει χρησιμοποιηθεί τεχνική ANOVA, το ανιχνεύσιμο μέγεθος της επίδρασης (π.χ. η ελάχιστη σημαντική διαφορά),
- διέγερση της ανάπτυξης που ενδεχομένως διαπιστώθηκε σε ομάδα αγωγής,
- τυχόν ορατά σημεία φυτοτοξικότητας, καθώς και παρατηρήσεις των διαλυμάτων δοκιμής,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων, όπου συμπεριλαμβάνεται η ενδεχόμενη επίδραση παρεκκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στα αποτελέσματα της δοκιμής.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) OECD TG 221 (2006) *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test
- (2) Η χρήση μελετών σε *Lemna* για έγχρωμες ουσίες περιγράφεται λεπτομερώς στο τμήμα 13.5.3 του Εγχειριδίου Αποφάσεων της ΕΕ του Ιουλίου του 2006, στην ιστοσελίδα <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals>
- (3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, διαθέσιμο στην ιστοσελίδα http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A
- (4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (5) USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.
- (6) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
- (7) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (στη σουηδική γλώσσα).
- (8) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37-120 pp
- (9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.
- (11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.
- (12) ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.
- (13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.
- (14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359.

- (15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
 - (16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): *Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves*. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
 - (17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
 - (18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
 - (19) OECD. (2004). *Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*.
 - (20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. *National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88*. USEPA, Duluth, MN.
 - (21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
 - (22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
 - (23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
 - (24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
 - (25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.
-

Προσάρτημα 1

Περιγραφή του φυτού *Lemna* SPP.

Το υδρόβιο φυτό *Lemna* spp., κοινώς λέμνα ή φακή του νερού, ανήκει στην οικογένεια λεμνίδες (*Lemnaceae*), που περιλαμβάνει ορισμένα κοσμοπολίτικα είδη, ταξινομημένα σε τέσσερα γένη. Οι διαφορές τους ως προς την εμφάνιση και τη συστηματική κατάταξη έχουν περιγραφεί εκτενώς (1)(2). Τα είδη *Lemna gibba* και *L. minor* είναι αντιπροσωπευτικά των εύκρατων περιοχών και χρησιμοποιούνται ευρέως σε δοκιμές τοξικότητας. Και τα δύο αυτά είδη έχουν έναν επιπλέοντα ή βυθισμένο δισκοειδή βλαστό (θαλλό), ενώ από το κέντρο της κάτω επιφάνειας κάθε θαλλού εξέρχεται μία λεπτότατη ρίζα. Η λέμνα σπάνια παράγει άνθη και τα φυτά πολλαπλασιάζονται με βλαστητική αναπαραγωγή, παράγοντας νέους θαλλούς (3). Σε σύγκριση με τα φυτά μεγαλύτερης ηλικίας, τα νεαρότερα έχουν ασθενέστερο χρώμα και βραχύτερες ρίζες και αποτελούνται από δύο έως τρεις θαλλούς διαφορετικών μεγεθών. Το μικρό μέγεθος της λέμνας, η απλή δομή της, η αγενής αναπαραγωγή της και ο μικρός χρόνος γενεάς καθιστούν τα φυτά του γένους αυτού ιδιαίτερα κατάλληλα για εργαστηριακές δοκιμές (4) (5).

Λόγω πιθανών διειδικών διαφορών στην ευαισθησία, μόνο οι συγκρίσεις ευαισθησίας εντός του ίδιου είδους είναι έγκυρες.

Παραδείγματα ειδών λέμνας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές: αναφορά των ειδών στη βιβλιογραφία

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Πηγές ειδών λέμνας

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
M5S 3 B2 Toronto, Ontario Καναδάς
Τηλ.: +1-416-978-3641
Φαξ: +1-416-978-5878
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: jacreman@botany.utoronto.ca
Διαδίκτυο: <http://www.botany.utoronto.ca/utcc>

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
ΗΠΑ
Τηλ.: +1 (919) 515-7572
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 Stockholm
Σουηδία
Τηλ.: +46 8 674 7240
Φαξ: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Γερμανία
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: lemna@uba.de
Διαδίκτυο: <http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm>

Βιβλιογραφία

- (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.
-

Προσάρτημα 2

Διατήρηση της μητρικής καλλιέργειας

Οι μητρικές καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε χαμηλότερη θερμοκρασία (4-10 °C) για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, χωρίς να χρειάζεται να παρασκευαστούν εκ νέου. Για τις μητρικές καλλιέργειες μπορεί να χρησιμοποιείται το ίδιο θρεπτικό υλικό με εκείνο της δοκιμής, αλλά και άλλα, πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία υλικά.

Κατά διαστήματα, μερικά νεαρά φυτά χρώματος ανοικτού πράσινου μεταφέρονται με τεχνική ασηψίας σε νέα δοχεία καλλιέργειας, τα οποία περιέχουν πρόσφατα παρασκευασμένο υλικό. Στις συνθήκες χαμηλότερης θερμοκρασίας που υποδεικνύονται στη παρούσα μέθοδο, η ανακαλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιείται ανά τρίμηνο κατ' ανώτατο όριο.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικώς καθαρά (έκπλυση με οξέα) και στείρα γυάλινα δοχεία καλλιέργειας και να εφαρμόζονται τεχνικές εργασίας σε συνθήκες ασηψίας. Εάν μολυνθεί η μητρική καλλιέργεια, π.χ. από φύκη ή μύκητες, απαιτούνται μέτρα για την εξάλειψη των ξένων οργανισμών. Στην περίπτωση των φυκών και των περισσότερων άλλων ξένων οργανισμών, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με επιφανειακή αποστείρωση. Λαμβάνεται δείγμα του μολυσμένου φυτικού υλικού και κόβονται οι ρίζες. Στη συνέχεια, το υλικό αυτό αναταράσσεται ζωηρά μέσα σε καθαρό νερό και εμβαπτίζεται σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5 % (v/v) για χρονικό διάστημα μεταξύ 30 δευτερολέπτων και 5 λεπτών. Το φυτικό υλικό εκπλύνεται, κατόπιν, με στείρο νερό και κατανέμεται σε έναν ορισμένο αριθμό δοχείων καλλιέργειας που περιέχουν πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό (παρτίδες). Η κατεργασία αυτή έχει ως επακόλουθο τον θάνατο πολλών θαλλών, ιδίως όταν η έκθεση διαρκεί περισσότερο χρόνο, αλλά ορισμένοι από τους επιζώντες είναι συνήθως απαλλαγμένοι από μόλυνση. Οι τελευταίοι μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν για τον εμβολιασμό νέων καλλιεργειών.

Προσάρτημα 3

Θρεπτικά υλικά

Συνιστώνται διαφορετικά θρεπτικά υλικά για τα είδη *L. minor* και *L. gibba*. Για το *L. minor*, συνιστάται το υλικό του Σουηδικού Ινστιτούτου Τυποποίησης (SIS), τροποποιημένο, ενώ για το *L. gibba*, το υλικό 20X AAP. Η σύσταση των δύο υλικών παρατίθεται κατωτέρω. Κατά τη παρασκευή των εν λόγω υλικών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστήριου ή αναλυτικής και απιονισμένο νερό.

Σουηδικό πρότυπο θρεπτικό υλικό για λέμνα (SIS)

- Τα μητρικά διαλύματα I-V αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο (120 °C, 15 λεπτά) ή με διήθηση μέσω μεμβράνης (διάμετρος πόρων 0,2 μm περίπου).
- Τα μητρικά διαλύματα VI και VII (προαιρετικό) αποστειρώνονται μόνο με διήθηση μέσω μεμβράνης και δεν πρέπει να θερμαίνονται σε αυτόκαυστο.
- Τα στεία μητρικά διαλύματα θα πρέπει να φυλάσσονται σε συνθήκες ψύχους και σκότους. Τα διαλύματα I-V θα πρέπει να απορρίπτονται μετά από έξι μήνες, ενώ η διάρκεια αποθήκευσης των διαλυμάτων VI και VII (προαιρετικό) είναι ένας μήνας.

Αριθ. μητρικού διαλύματος	Ουσία	Συγκέντρωση στο μητρικό διάλυμα (g·l ⁻¹)	Συγκέντρωση στο παρασκευαζόμενο υλικό (mg·l ⁻¹)	Παρασκευαζόμενο υλικό	
				Στοιχείο	Συγκέντρωση (mg·l ⁻¹)
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 (ρυθμιστικό διάλυμα)	490	490	—	—

- Για την παρασκευή 1 λίτρου υλικού SIS, προστίθενται σε 900 ml απιονισμένου νερού τα ακόλουθα:
 - 10 ml μητρικού διαλύματος I
 - 5 ml μητρικού διαλύματος II
 - 5 ml μητρικού διαλύματος III
 - 5 ml μητρικού διαλύματος IV
 - 1 ml μητρικού διαλύματος V
 - 5 ml μητρικού διαλύματος VI
 - 1 ml μητρικού διαλύματος VII (προαιρετικά).

Σημ.: Για ορισμένες ελεγχόμενες ουσίες, ενδέχεται να χρειάζεται ένα επιπλέον μητρικό διάλυμα, VII [ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (μορφολινο-προπανοσουλφονικό οξύ) — βλέπε σημείο 1.4, τελευταίο εδάφιο].

- Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6,5 ± 0,2 με 0,1 ή 1 mol HCl ή NaOH και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο με απιονισμένο νερό.

Θρεπτικό υλικό 20X AAP

Τα μητρικά διαλύματα παρασκευάζονται με στείρο απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

Τα στείρα μητρικά διαλύματα θα πρέπει να φυλάσσονται σε συνθήκες ψύχους και σκότους. Στις συνθήκες αυτές, η διάρκεια αποθήκευσης των διαλυμάτων είναι τουλάχιστον 6-8 εβδομάδες.

Για το υλικό 20X — AAP, παρασκευάζονται πέντε μητρικά διαλύματα θρεπτικών στοιχείων (A1, A2, A3, B και Γ), με χρήση χημικών ουσιών καθαρότητας αντιδραστηρίου. Λαμβάνονται 20 ml από κάθε μητρικό διάλυμα θρεπτικών στοιχείων και προστίθενται σε περίπου 850 ml απιονισμένου νερού για να προκύψει το θρεπτικό υλικό. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή $7,5 \pm 0,1$ με 0,1 ή 1 mol HCl ή NaOH και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο με απιονισμένο νερό. Το υλικό διηθείται κατόπιν σε στείρο υποδοχέα μέσω διηθητικής μεμβράνης των 0,2 μm (περίπου).

Το θρεπτικό υλικό που προορίζεται για τη διεξαγωγή της δοκιμής θα πρέπει να έχει παρασκευαστεί 1-2 ημέρες πριν χρησιμοποιηθεί, ώστε να είναι δυνατόν να σταθεροποιηθεί το pH. Το pH του θρεπτικού υλικού θα πρέπει να ελέγχεται πριν από τη χρήση του και, εάν είναι απαραίτητο, να ρυθμίζεται εκ νέου με την προσθήκη διαλύματος NaOH ή HCl 0,1 ή 1 M, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Αριθμός μητρικού διαλύματος	Ουσία	Συγκέντρωση στο μητρικό διάλυμα (g·l ⁻¹) (*)	Συγκέντρωση στο παρασκευαζόμενο υλικό (mg·l ⁻¹) (*)	Παρασκευαζόμενο υλικό	
				Στοιχείο	Συγκέντρωση (mg·l ⁻¹) (*)
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
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 ⁻¹	66 μg·l ⁻¹	Zn	31 μg·l ⁻¹
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,4 mg·l ⁻¹	29 μg·l ⁻¹	Co	7,1 μg·l ⁻¹
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,3 mg·l ⁻¹	145 μg·l ⁻¹	Mo	58 μg·l ⁻¹
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,012 mg·l ⁻¹	0,24 μg·l ⁻¹	Cu	0,080 μg·l ⁻¹	
Γ	NaHCO ₃	15	300	Na · C	220 · 43

(*) Εκτός αντίθετης μνείας.

Σημείωση: Η θεωρητικά ενδεδειγμένη τελική συγκέντρωση οξείων ανθρακικών ιόντων (η οποία αποτρέπει την αισθητή ρύθμιση του pH) είναι 15 mg/l και όχι 300 mg/l. Ωστόσο, η χρήση του υλικού 20X-AAP στο παρελθόν, συμπεριλαμβανομένης της κυκλικής δοκιμής της παρούσας μεθόδου, έχει βασιστεί σε 300 mg/l (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency).

Θρεπτικό υλικό Steinberg (κατά το πρότυπο ISO 20079)**Συγκεντρώσεις και μητρικά διαλύματα**

- Κατά το πρότυπο ISO 20079, το τροποποιημένο υλικό Steinberg χρησιμοποιείται μόνο για το είδος *Lemna minor* (δεδομένου ότι το πρότυπο αυτό επιτρέπει μόνο το *Lemna minor*), αλλά έχει αποδειχθεί με δοκιμές ότι είναι δυνατόν να επιτευχθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα με τη χρήση του και για το είδος *Lemna gibba*.
- Κατά την παρασκευή του εν λόγω υλικού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής και απιονισμένο νερό.
- Παρασκευάζεται το θρεπτικό υλικό από μητρικά διαλύματα ή από το πυκνό υλικό δεκαπλάσιας συγκέντρωσης, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης χωρίς καθίζηση.

Πίνακας 1

Υλικό Steinberg σταθερού pH (τροποποιημένο κατά Altenburger)

Ουσία		Θρεπτικό υλικό	
Μακροθρεπτικά στοιχεία	Μοριακό βάρος	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41
Μικροθρεπτικά στοιχεία	Μοριακό βάρος	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, διένυδρο άλας με νάτριο	372,24	1 500,00	4,03

Πίνακας 2

Μητρικά διαλύματα (μακροθρεπτικά στοιχεία)

1. Μακροθρεπτικά στοιχεία (σε 50πλάσια συγκέντρωση)	g/l
Μητρικό διάλυμα 1:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
Μητρικό διάλυμα 2:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
Μητρικό διάλυμα 3:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Πίνακας 3

Μητρικά διαλύματα (μικροθρεπτικά στοιχεία)

2. Μικροθρεπτικά στοιχεία (σε εκατονταπλάσια συγκέντρωση)	mg/l
Μητρικό διάλυμα 4:	
H ₃ BO ₃	120,0
Μητρικό διάλυμα 5:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Μητρικό διάλυμα 6:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0
Μητρικό διάλυμα 7:	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
Μητρικό διάλυμα 8:	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
EDTA, διένυδρο άλας με νάτριο	1 500,00

- Τα μητρικά διαλύματα αριθ. 2 και 3, όπως επίσης τα διαλύματα αριθ. 4 έως 7 είναι δυνατόν να ενωθούν (λαμβάνομένων υπόψη των απαιτούμενων συγκεντρώσεων).
- Για να παραταθεί η διάρκεια αποθήκευσης, τα μητρικά διαλύματα θερμαίνονται σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά ή, εναλλακτικά, υποβάλλονται σε αποστειρωτική διήθηση (ηθμός των 0,2 μm). Στην περίπτωση του μητρικού διαλύματος αριθ. 8, συνιστάται ένθερμα η αποστειρωτική διήθηση (ηθμός των 0,2 μm).

Παρασκευή του (τροποποιημένου) υλικού Steinberg με την τελική συγκέντρωση

- Σε 900 ml απιονισμένου νερού περίπου, προστίθενται 20 ml από τα μητρικά διαλύματα αριθ. 1, 2 και 3 (βλέπε πίνακα 2), κατά τρόπο ώστε να αποφευχθεί η καθίζηση.
- Προστίθεται 1,0 ml από τα μητρικά διαλύματα αριθ. 4, 5, 6, 7 και 8 (βλέπε πίνακα 3).
- Το pH θα πρέπει να είναι $5,5 \pm 0,2$ (ρυθμίζεται με την προσθήκη του ελάχιστου δυνατού όγκου διαλύματος NaOH ή HCl).
- Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με νερό.
- Εάν τα μητρικά διαλύματα είναι αποστειρωμένα και χρησιμοποιείται το ενδεδειγμένο νερό, δεν απαιτείται περαιτέρω αποστείρωση. Εάν αποστειρώνεται το τελικό υλικό, το μητρικό διάλυμα αριθ. 8 θα πρέπει να προστίθεται μετά τη θέρμανση σε αυτόκαυστο (στους 121 °C για 20 λεπτά).

Παρασκευή του πυκνού (τροποποιημένου) υλικού Steinberg με δεκαπλάσια συγκέντρωση για ενδιάμεση αποθήκευση

- Σε 30 ml απιονισμένου νερού περίπου, προστίθενται 20 ml από τα μητρικά διαλύματα αριθ. 1, 2 και 3 (βλέπε πίνακα 2), κατά τρόπο ώστε να αποφευχθεί η καθίζηση.
 - Προστίθεται 1,0 ml από τα μητρικά διαλύματα αριθ. 4, 5, 6, 7 και 8 (βλέπε πίνακα 3). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 100 ml με νερό.
 - Εάν τα μητρικά διαλύματα είναι αποστειρωμένα και χρησιμοποιείται το ενδεδειγμένο νερό, δεν απαιτείται περαιτέρω αποστείρωση. Εάν αποστειρώνεται το τελικό υλικό, το μητρικό διάλυμα αριθ. 8 θα πρέπει να προστίθεται μετά τη θέρμανση σε αυτόκαυστο (στους 121 °C για 20 λεπτά).
 - Το pH του υλικού (τελική συγκέντρωση) θα πρέπει να είναι $5,5 \pm 0,2$.
-