

ΜΕΡΟΣ Γ: ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΜΕΡΟΣ Γ

Οι μέθοδοι δοκιμασίας που περιγράφονται παρακάτω αφορούν τον προσδιορισμό ορισμένων από τις οικοτοξικολογικές ιδιότητες που περιλαμβάνονται στο παράρτημα VIII της οδηγίας 79/831/ΕΟΚ. Τα πρόσωπα που κοινοποιούν μια ουσία στην αρμόδια αρχή πρέπει να γνωρίζουν ότι στο κείμενο δεν περιλαμβάνονται μέθοδοι προσδιορισμού των ακόλουθων ιδιοτήτων, που προβλέπει το επίπεδο 1 του παραρτήματος VIII:

- μελέτη παρατεταμένης τοξικότητας με *Daphnia magna*,
- δοκιμασία επί ανωτέρου φυτού,
- μελέτη παρατεταμένης τοξικότητας με ιχθύες,

Όταν διαμορφωθούν οριστικά οι κατάλληλες για τον προσδιορισμό των εν λόγω ιδιοτήτων μέθοδοι δοκιμασίας, θα δημοσιευθούν υπό τη μορφή περαιτέρω προσαρμογής στην τεχνική πρόοδο. Εν τω μεταξύ οι κοινοποιούντες πρέπει να χρησιμοποιούν κατάλληλες, μεθόδους διεθνώς αναγνωρισμένες, τις οποίες οφείλουν να δηλώνουν στην αρμόδια αρχή.

Γ. 8

ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΓΑΙΟΣΚΩΛΗΚΕΣ

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΤΕΧΝΗΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Στην εργαστηριακή αυτή δοκιμασία, η ελεγχόμενη ουσία προστίθεται σε τεχνητό έδαφος στο οποίο τοποθετούνται γαιοσκώληκες για 14 ημέρες. Μετά την περίοδο αυτή (και προαιρετικά μετά από επτά ημέρες) εξετάζεται η θανατηφόρος δράση της ουσίας στους γαιοσκώληκες. Η δοκιμασία παρέχει μέθοδο για τη σχετικά βραχυπρόθεσμη παρακολούθηση της δράσης χημικών ουσιών στους γαιοσκώληκες, με πρόσληψη από το δέρμα ή την τροφική οδό.

1.2. Ορισμός και μονάδα

LC₅₀: Η συγκέντρωση μιας ουσίας που υπολογίζεται ότι σκοτώνει το 50 % των πειραματοζώων κατά την περίοδο της δοκιμασίας.

1.3. Ουσία αναφοράς

Χρησιμοποιείται περιοδικά μια ουσία αναφοράς για να επιβεβαιώνεται ότι η ευαισθησία του συστήματος ελέγχου δεν έχει μεταβληθεί σημαντικά.

Ως ουσία αναφοράς συνιστάται το χλωροακεταμίδιο αναλυτικής καθαρότητας.

1.4. Αρχή της δοκιμασίας

Το έδαφος είναι μεταβλητό μέσο, ώστε στη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται τεχνητό αργιλώδες έδαφος που έχει καθοριστεί με προσοχή. Ενήλικες γαιοσκώληκες του είδους *Eisenia foetida* (βλέπε σημείωση στο προσάρτημα) διατηρούνται σε καθορισμένο τεχνητό έδαφος που έχει υποστεί κατεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Το περιεχόμενο των δοχείων απλώνεται σε δίσκο 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμασίας και μετριοούνται οι γαιοσκώληκες που έχουν επιζήσει σε κάθε συγκέντρωση.

1.5. Ποιοτικά κριτήρια

Η δοκιμασία έχει μελετηθεί για να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δυνατή αναπαραγωγιμότητα σε σχέση με το υπόστρωμα και τον οργανισμό έλεγχου. Η θνησιμότητα των μαρτύρων στο τέλος της δοκιμασίας δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 %, διαφορετικά η δοκιμασία είναι άκυρη.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

1.6.1. Υλικά

1.6.1.1. Υπόστρωμα δοκιμασίας

Ως βασικό υπόστρωμα για τη δοκιμασία χρησιμοποιείται καθορισμένο τεχνητό έδαφος.

- α) Βασικό υπόστρωμα (τα ποσοστά εκφράζουν ξηρό βάρος)
 - 10 % τύρφη σφάγγων (με pH όσο το δυνατό πλησιέστερα στο 5,5 – 6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτού και λεπτά αλεσμένα),
 - 20 % άργιλος καολινίτη, κατά προτίμηση με περισσότερο από 50 % καολινίτη,
 - 69 % περίπου βιομηχανική γαλαζιακή άμμος (να υπερσίζει η λεπτή άμμος με ποσοστό περισσότερο από 50 % σε μέγεθος σωματιδίων 0,05 έως 0,2 mm). Αν η ουσία δεν διασπείρεται αρκετά στο νερό, φυλάσσονται 10 g ανά δοχείο δοκιμασίας για να αναμειχθούν αργότερα με τη δοκιμαζόμενη ουσία.
 - 1 % περίπου ανθρακικό ασβέστιο (CaCO₃), κοκιοποιημένο, χημικά καθαρό, που προστίθεται για να ρυθμιστεί το pH στο 6,0 ± 0,5.

β) Υπόστρωμα δοκιμασίας

Το υπόστρωμα δοκιμασίας περιέχει το βασικό υπόστρωμα, την ελεγχόμενη ουσία και απιονισμένο νερό.

Η περιεκτικότητα σε νερό είναι περίπου 25 έως 42 % του ξηρού βάρους του βασικού υποστρώματος και προσδιορίζεται με ξήρανση ενός δείγματος στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους. Το κριτήριο-κλειδί είναι ότι το τεχνητό έδαφος πρέπει να υγρανθεί τόσο ώστε να μην υπάρχει στάσιμο νερό. Η ανάμειξη γίνεται με προσοχή για να ληφθεί ομοιόμορφη κατανομή της δοκιμαζόμενης ουσίας στο υπόστρωμα. Ο τρόπος ενσωμάτωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας στο υπόστρωμα πρέπει να αναφέρεται.

γ) Υπόστρωμα-μάρτυρας

Το υπόστρωμα-μάρτυρας περιέχει το βασικό υπόστρωμα και νερό. Αν χρησιμοποιούνται πρόσθετα, παρασκευάζονται συμπληρωματικός μάρτυρας που περιέχει την ίδια ποσότητα προσθέτου.

- 1.6.1.2. **Δοχεία δοκιμασίας**
Είναι γυάλινα δοχεία χωρητικότητας ενός λίτρου περίπου (κατάλληλα σκεπασμένα με πλαστικά καλύμματα, πλάκες ή με πλαστική μεμβράνη με σπές αερισμού), γεμάτα με μια ποσότητα υγρού υποστρώματος ελέγχου ή μάρτυρα που ισοδυναμεί με 500 g ξηρού βάρους υποστρώματος.
- 1.6.2. **Συνθήκες δοκιμασίας**
Τα δοχεία διατηρούνται σε κλιματιζόμενους θαλάμους σε θερμοκρασία 20 ± 2 °C με συνεχές φως. Η ένταση του φωτός θα πρέπει να είναι 400 έως 800 lux.
Η περίοδος δοκιμασίας είναι 14 ημέρες αλλά η θνησιμότητα μπορεί να υπολογιστεί προαιρετικά επτά ημέρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας.
- 1.6.3. **Διαδικασία δοκιμασίας**
Συγκεντρώσεις δοκιμασίας
Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας εκφράζονται ως βάρος της ουσίας ανά ξηρό βάρος του βασικού υποστρώματος (mg/kg).
Δοκιμασία προσδιορισμού σειράς
Η σειρά των συγκεντρώσεων που προξενούν θνησιμότητα από 0 μέχρι 100% μπορεί να βρεθεί με δοκιμασία προσδιορισμού σειράς ώστε να συγκεντρωθούν πληροφορίες για τη σειρά συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στην οριστική δοκιμασία.
Οι ουσίες ελέγχονται στις εξής συγκεντρώσεις: 1 000, 100, 10, 1 και 0,1 mg ουσίας/kg υποστρώματος ελέγχου (ξηρό βάρος).
Αν πρόκειται να διεξαχθεί πλήρης οριστική δοκιμασία, ένας κύκλος δοκιμασίας ανά συγκέντρωση και ένας για τον μάρτυρα που δεν έχει υποστεί κατεργασία, καθένας με δέκα σκόληκες, επαρκούν για τη δοκιμασία προσδιορισμού σειράς.
Οριστική δοκιμασία
Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας προσδιορισμού σειράς χρησιμοποιούνται για την εκλογή πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεων σε γεωμετρική σειρά που να καλύπτουν ακριβώς την κλίμακα θνησιμότητας 0 έως 100% και να διαφέρουν κατά σταθερό συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 1,8.
Η δοκιμασία που εκτελείται με αυτές τις σειρές συγκεντρώσεων επιτρέπει να προσδιοριστούν με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια η τιμή LC₅₀ και τα όρια εμπιστοσύνης γι' αυτήν.
Στην οριστική δοκιμασία διεξάγονται τέσσερις τουλάχιστον κύκλοι ελέγχου ανά συγκέντρωση και τέσσερις για τους μάρτυρες που δεν έχουν υποστεί κατεργασία, καθένας με δέκα σκόληκες. Το αποτέλεσμα αυτών των σειρών δοκιμών εκφράζονται ως μέσος όρος και τυπική απόκλιση.
Όταν δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις με λόγο 1,8 προκαλούν θνησιμότητα μόνο 0% και 100%, οι δύο αυτές τιμές είναι αρκετές για να δειχθεί η περιοχή τιμών μέσα στην οποία βρίσκεται η τιμή της LC₅₀.
Ανάμειξη του βασικού υποστρώματος δοκιμασίας και της δοκιμαζόμενης ουσίας
Το υπόστρωμα δοκιμασίας θα πρέπει, κατά το δυνατό, να παρασκευάζεται χωρίς άλλα πρόσθετα μέσα εκτός από νερό. Αμέσως πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, ένα γαλάκτωμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης ουσίας σε απιονισμένο νερό ή άλλο διαλύτη αναμειγνύεται με το βασικό υπόστρωμα δοκιμασίας ή ψεκάζεται ομοιόμορφα πάνω από αυτό με λεπτό χρωματογραφικό ή παρόμοιο ψεκαστήρα.
Αν η ελεγχόμενη ουσία δεν διαλύεται στο νερό, είναι δυνατόν να διαλυθεί σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. εξάνιο, ακετόνη ή χλωροφόρμιο).
Μόνο μέσα που εξαερώνονται εύκολα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαλυτοποίηση, διασπορά ή γαλακτωματοποίηση της ελεγχόμενης ουσίας. Το υπόστρωμα ελέγχου πρέπει να αερίζεται πριν χρησιμοποιηθεί. Η ποσότητα νερού που εξατμίζεται πρέπει να αναπληρώνεται. Ο μάρτυρας περιέχει την ίδια ποσότητα από οποιαδήποτε πρόσθετο.
Αν η δοκιμαζόμενη ουσία δεν διαλύεται, διασπείρεται ή γαλακτωματοποιείται σε οργανικούς διαλύτες, 10 g ενός μείγματος από λεπτή κοινοποιημένη χαλαζιακή άμμο και την ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας που απαιτείται για την κατεργασία 500 g ξηρού βάρους τεχνητού εδάφους, αναμειγνύονται με 490 g ξηρού βάρους υποστρώματος δοκιμασίας.
Για κάθε κύκλο δοκιμασίας, ποσότητα υγρού υποστρώματος δοκιμασίας που ισοδυναμεί με 500 g ξηρού βάρους τοποθετείται σε κάθε γυάλινο δοχείο. Δέκα γαιοσκόληκες, που έχουν προκαλλιεργηθεί για 24 ώρες σε παρόμοιο υγρό βασικό υπόστρωμα, στη συνέχεια έχουν πλυθεί και η περισσεια του νερού έχει απορροφηθεί με διηθητικό χαρτί πριν χρησιμοποιηθούν, τοποθετούνται στην επιφάνεια του υποστρώματος δοκιμασίας.
Τα δοχεία καλύπτονται με διάτρητα πλαστικά καλύμματα, πλάκες ή μεμβράνη για να μην ξηραθεί το υπόστρωμα και διατηρούνται στις συνθήκες της δοκιμασίας για 14 ημέρες.
Οι εκτιμήσεις γίνονται 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμασίας. Το υπόστρωμα απλώνεται σε δίσκο κατασκευασμένο από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα. Εξετάζονται οι γαιοσκόληκες και προσδιορίζεται ο αριθμός αυτών που επιζούν. Οι γαιοσκόληκες θεωρούνται νεκροί αν δεν αντιδρούν σε ελαφρό μηχανικό ερέθισμό στο πρόσθιο άκρο τους.
Όταν η εξέταση γίνεται μετά από επτά ημέρες, το δοχείο γεμίζεται πάλι με το υπόστρωμα και οι επιζώντες γαιοσκόληκες επανατοποθετούνται στην επιφάνεια του ίδιου υποστρώματος ελέγχου.

1.6.4. **Οργανισμοί δοκιμασίας**

Οι οργανισμοί δοκιμασίας θα πρέπει να είναι ενήλικες *Eisenia foetida* (βλέπε σημείωση στο προσάρτημα) (ηλικίας τουλάχιστον δύο μηνών, με δακτυλοειδή τμήματα) υγρού βάρους 300 έως 600 mg. (Για μέθοδο εκτροφής βλέπε προσάρτημα.)

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. **Επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων**

Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας αναφέρονται σε συσχετισμό με τα αντίστοιχα ποσοστά νεκρών γαιοσκωλήκων.

Όταν τα δεδομένα είναι αρκετά, η τιμή LC_{50} και τα όρια εμπιστοσύνης ($p = 0,05$) προσδιορίζονται με πρότυπες μεθόδους (Litchfield και Wilcoxon, 1949, ή αντίστοιχη μέθοδο). Η τιμή LC_{50} δίνεται ως mg της ελεγχόμενης ουσίας ανά kg υποστρώματος ελέγχου (ξηρό βάρος).

Σε περίπτωση που η κλίση της καμπύλης συγκεντρώσεων είναι πολύ μεγάλη και δεν επιτρέπει τον υπολογισμό της LC_{50} , αρκεί ο γραφικός υπολογισμός της τιμής αυτής.

Όταν δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις με λόγο 1,8 προκαλούν θνησιμότητα μόνο 0% και 100%, οι δύο αυτές τιμές είναι αρκετές για να δείχνει η περιοχή τιμών μέσα στην οποία βρίσκεται η τιμή της LC_{50} .

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση της δοκιμασίας περιλαμβάνει, αν είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

- δήλωση ότι η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα παραπάνω ποιοτικά κριτήρια,
- τη δοκιμασία που πραγματοποιήθηκε (δοκιμασία προσδιορισμού σειράς ή/και οριστική δοκιμασία),
- ακριβή περιγραφή των συνθηκών της δοκιμασίας ή δήλωση ότι η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο· οποιεσδήποτε παρεκκλίσεις πρέπει να αναφέρονται,
- ακριβή περιγραφή του τρόπου με τον οποίο η δοκιμαζόμενη ουσία αναμείχθηκε με το βασικό υπόστρωμα δοκιμασίας,
- πληροφορίες για τους οργανισμούς δοκιμασίας (είδος, ηλικία, μέσος όρος και κλίμακα βάρους, συνθήκες διατήρησης και αναπαραγωγής, προμηθευτής),
- τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της LC_{50} ,
- τα αποτελέσματα της δοκιμασίας, συμπεριλαμβανομένων όλων των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν,
- περιγραφή συμπτωμάτων ή αλλαγών συμπεριφοράς που παρατηρήθηκαν στους οργανισμούς των μαρτύρων,
- τη θνησιμότητα των μαρτύρων,
- την τιμή LC_{50} ή την υψηλότερη συγκέντρωση ελέγχου που δεν προκάλεσε θνησιμότητα και τη χαμηλότερη συγκέντρωση που προκάλεσε θνησιμότητα 100%, 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμασίας,
- γραφική παράσταση της καμπύλης συγκέντρωσης/απόκρισης,
- τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με την ουσία αναφοράς, είτε στα πλαίσια της δοκιμασίας αυτής είτε από προηγούμενα πειράματα ποιοτικού ελέγχου.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

- (1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 207*, απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.
- (2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms*. Chapman and Hall, London, 331 pp.
- (3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*, Institut national de la recherche agronomique, 671 pp.
- (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. of Pharm. and Exp. Therap.*, 1, vol. 96, 1949, p. 99.
- (5) Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*, έκθεση EUR 8714 EN, 1983.
- (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden“*, in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Προσάρτημα

Αναπαραγωγή και διατήρηση των σκωλήκων πριν από τη δοκιμασία

Για την αναπαραγωγή οργανισμών, 30 έως 50 ενήλικες σκωλήκες τοποθετούνται σε δοχείο αναπαραγωγής με φρέσκο υπόστρωμα και μεταφέρονται μετά από 14 ημέρες. Οι οργανισμοί αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για νέους κύκλους αναπαραγωγής. Οι γαιοσκώληκες που εκκολάπτονται από τους βέμβικες χρησιμοποιούνται για τη δοκιμασία αφού ωριμάσουν (στις συνθήκες που καθορίζονται, μετά από δύο έως τρεις μήνες).

Συνθήκες διατήρησης και αναπαραγωγής

Κλιματιζόμενος θάλαμος: θερμοκρασία 20 ± 2 °C, κατά προτίμηση με συνεχές φως (ένταση 400 έως 800 lux).

Δοχεία αναπαραγωγής: κατάλληλα ρηχά δοχεία με όγκο 10 έως 20 l.

Υπόστρωμα: Οι οργανισμοί *Eisenia foetida* μπορούν να αναπαραχθούν σε διάφορα ζωικά περιττώματα. Συνιστάται η χρήση ενός μείγματος από 50% κατ' όγκο τύρφη και 50% κοπριά αγελάδας ή αλόγου σαν υλικού αναπαραγωγής. Το υλικό θα πρέπει να έχει pH 6 έως 7 περίπου (ρυθμίζεται με ανθρακικό ασβέστιο) και χαμηλή ιονική αγωγιμότητα (λιγότερο από 6 mmhos ή 0,5% συγκέντρωση αλάτων)

Το υπόστρωμα θα πρέπει να είναι υγρό αλλά όχι πολύ βρεγμένο.

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και άλλες επιτυχείς μέθοδοι.

Σημείωση: Οι γαιοσκώληκες *Eisenia foetida* απαντούν σε δύο οικογένειες, τις οποίες ορισμένοι ειδικοί στην ταξινόμηση έχουν διαχωρίσει σε είδη (Bouche, 1972). Οι δύο οικογένειες είναι παρόμοιες μορφολογικά αλλά η μία, *Eisenia foetida foetida*, παρουσιάζει τυπικές εγκάρσιες ζώνες ή λωρίδες στα μεταμερίδια ενώ η άλλη, *Eisenia foetida andrei*, δεν τις έχει και είναι ποικιλόχρωμη με κοκκινωπή απόχρωση. Αν είναι δυνατόν, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η *Eisenia foetida andrei*. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη αν είναι γνωστή η αναγκαία μεθοδολογία.

ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ZAHN-WELLENS

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Η μέθοδος αποβλέπει στην εκτίμηση της δυνητική τελικής βιοαποικοδομητικότητας υδατοδιαλυτών, μη κητιικών οργανικών ουσιών, όταν αυτές εκτίθενται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών σε στατιστική δοκιμασία.

Στα εν αιώρησι στερεά, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί φυσικοχημική προσρόφηση και αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 3.2.).

Οι υπό μελέτη ουσίες χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν σε τιμές DOC μεταξύ 50 και 400 mg/l ή τιμές COD μεταξύ 100 και 1000 mg/l (DOC = dissolved organic carbon/διαλελυμένος οργανικός άνθρακας; COD = chemical oxygen demand/χημική απαίτηση σε οξυγόνο). Οι σχετικές υψηλές αυτές συγκεντρώσεις παρασιτάζουν το πλεονέκτημα της αναλυτικής αξιοπιστίας. Ενώσεις με τοξικές ιδιότητες μπορούν να επιβραδύνουν ή να αναστείλουν τη διαδικασία αποικοδόμησης.

Στη μέθοδο αυτή, η μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα ή της χημικής απαίτησης σε οξυγόνο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της τελικής βιοαποικοδόμησης της ουσίας που υποβάλλεται στη δοκιμασία.

Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου μπορεί να επιτρέπει τον προσδιορισμό της πρωτογενούς βιοαποικοδόμησης της ουσίας (εξαφάνιση της αρχικής χημικής δομής).

Η μέθοδος εφαρμόζεται αποκλειστικά στις υπό δοκιμασία οργανικές ουσίες εφόσον, στη συγκέντρωση υπό την οποία χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία:

- είναι υδατοδιαλυτές στις συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγεται η δοκιμασία,
- η τάση των ατμών τους στις συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγεται η δοκιμασία είναι αμελητέα,
- δεν αποτελούν αντιβακτηριακούς παράγοντες,
- η προσρόφηση τους στο σύστημα της δοκιμασίας είναι περιορισμένη,
- δεν χάνονται από το διάλυμα της δοκιμασίας λόγω του σχηματισμού αφρού.

Στοιχεία που αφορούν τη σχετική αναλογία των κυριότερων συστατικών του υπό δοκιμασία υλικού θα είναι χρήσιμα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδίως στις περιπτώσεις όπου οι τιμές των αποτελεσμάτων είναι μικρές ή οριακές.

Είναι σκόπιμο να γνωστοποιούνται τα στοιχεία που αφορούν την τοξικότητα της ουσίας σε μικροοργανισμούς προκειμένου να χρησιμοποιούνται στην ερμηνεία των χαμηλών τιμών των αποτελεσμάτων και στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων για τη δοκιμασία.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Ο βαθμός αποικοδόμησης που λαμβάνεται στο τέλος της δοκιμασίας αναφέρεται ως «βιοαποικοδομητικότητα στην δοκιμασία Zahn-Wellens»

$$D_T (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

όπου:

D_T = βιοαποικοδόμηση (%) σε χρόνο T,

C_A = τιμές DOC (ή COD) στο μείγμα τις δοκιμασίας, η μέτρηση των οποίων έχει γίνει τρεις ώρες μετά από την έναρξη της δοκιμασίας (mg/l) (DOC = dissolved organic carbon/διαλελυμένος οργανικός άνθρακας; COD = chemical oxygen demand/χημική απαίτηση σε οξυγόνο),

C_T = τιμές DOC ή COD στο μείγμα της δοκιμασίας, τη στιγμή της δειγματοληψίας (mg/l),

C_B = τιμή DOC ή COD της τυφλής δοκιμασίας τη στιγμή της δειγματοληψίας (mg/l),

C_{BA} = τιμή DOC ή COD της τυφλής δοκιμασίας, η μέτρηση της οποίας έχει γίνει τρεις ώρες μετά από την έναρξη της δοκιμασίας (mg/l).

Ο αριθμός που εκφράζει το ύψος της αποικοδόμησης στρογγυλεύεται στην πλησιέστερη ακέραια εκατοστιαία μονάδα.

Η εκατοστιαία αποικοδόμηση εκφράζεται σε επί τους εκατό DOC (ή COD) αλώεια της υπό δοκιμασία ουσίας.

Η διαφορά μεταξύ της τιμής που μετρήθηκε μετά από τρεις ώρες και της αρχικής τιμής που έχει υπολογιστεί —ή καλύτερα μετρηθεί— μπορεί να παράσχει χρήσιμα στοιχεία για την αποικοδόμηση της ουσίας (βλέπε σημείο 3.2 «Ερμηνεία των αποτελεσμάτων»).

- 1.3. **Ουσίες αναφοράς**
- Σε μερικές περιπτώσεις ανάλυσης νέων ουσιών είναι χρήσιμη η παρουσία ουσιών αναφοράς. Ωστόσο δεν είναι ακόμη δυνατόν να διατυπωθούν συστάσεις για συγκεκριμένες ουσίες αναφοράς.
- 1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**
- Οι ενεργοποιημένες ιλύες, τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά και το υλικό της δοκιμασίας σε υδατικό διάλυμα ως αποκλειστική πηγή άνθρακα τοποθετούνται μαζί σε υάλινο δοχείο χωρητικότητας 1 έως 4 λίτρων, το οποίο φέρει αναδευτήρα και συσκευή για την εισαγωγή αέρα. Αναδεύεται το μείγμα και διοχετεύεται αέρας σε 20 έως 25 °C, υπό διάχυτο φωτισμό ή σε σκοτεινό θάλαμο επί 28 ημέρες κατά μέγιστο όριο. Η διαδικασία αποικοδόμησης παρακολουθείται προσδιορίζοντας τις τιμές DOC (ή COD) στο διηθηθέν διάλυμα, καθημερινά ή ανά τακτά διαστήματα. Η αναλογία του αποικοδομούμενου DOC (ή COD), μετά από κάθε ανάπαυλα, προς την τιμή της μέτρησης που διενεργείται τρεις ώρες μετά από την έναρξη εκφράζεται ως ποσοστό βιοαποικοδόμησης και χρησιμοποιεί ως μέτρο του βαθμού αποικοδόμησης τη στιγμή εκείνη. Η σημείωση των αποτελεσμάτων αυτών σε σύστημα συντεταγμένων σε συνάρτηση με τον παράγοντα χρόνος παρέχει την καμπύλη βιοαποικοδόμησης.
- Όταν χρησιμοποιείται μια ειδική αναλυτική μέθοδος είναι δυνατόν να μετρηθούν οι μεταβολές της συγκέντρωσης της αρχικής ένωσης, οι οποίες οφείλονται στη βιοαποικοδόμηση (πρωτογενής βιοαποικοδόμηση).
- 1.5. **Κριτήρια ποιότητας**
- Σε ένα ring test αποδείχθηκε η αναπαραγωγιμότητα ικανοποιητική.
- Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το βαθμό σταθερότητας της τυφλής δοκιμασίας και σε μικρότερο βαθμό από την ακρίβεια του προσδιορισμού του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα και το επίπεδο της ενώσεως της δοκιμασίας στο υγρό.
- 1.6. **Περιγραφή της διαδικασίας της δοκιμασίας**
- 1.6.1. **Προπαρασκευαστικές εργασίες**
- 1.6.1.1. **Αντιδραστήρια**
- Νερό που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία: πόσιμο νερό με περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα μικρότερη των 5 mg/l. Η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου μαζί δεν πρέπει να υπερβαίνει το επίπεδο των 2,7 mmole/l. Στην περίπτωση που δεν τηρηθεί το όριο αυτό απαιτείται αραίωση με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.
- | | |
|---|----------|
| Θεϊκό οξύ αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: | 50 g/l. |
| Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: | 40 g/l. |
| Ανόργανο θρεπτικό διάλυμα: διαλύονται σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού: | |
| χλωριούχο αμμόνιο, NH ₄ Cl, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: | 38,5 g, |
| δισόξινο φωσφορικό νάτριο, N ₈ H ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: | 33,4 g, |
| δισόξινο φωσφορικό κάλιο, K ₂ HPO ₄ , αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: | 8,5 g, |
| μονόξινο φωσφορικό κάλιο, K ₂ HPO ₄ , αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: | 21,75 g. |
- Το μείγμα χρησιμοποιεί τόσο ως θρεπτικό όσο και ως ρυθμιστικό διάλυμα.
- 1.6.1.2. **Όργανα**
- Υάλινα δοχεία χωρητικότητας 1 έως 4 λίτρων (π.χ. κυλινδρικά δοχεία).
- Αναδευτήρας με υάλινο ή μεταλλικό βραχίονα αναδέσεως σε κατάλληλο στέλεχος (ο βραχίονας πρέπει να περιστρέφεται σε ύψος 5 έως 10 cm περίπου από τον πυθμένα του δοχείου). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά μαγνητικός αναδευτήρας μήκους 7 έως 10 cm.
- Υάλινο σωλήνας εσωτερικής διαμέτρου 2 έως 4 mm για την εισαγωγή αέρα. Το στόμιο του σωλήνα πρέπει να είναι σε ύψος 1 cm περίπου από τον πυθμένα του δοχείου.
- Συσκευή φυγοκεντρήσεως (περίπου 3 550 g).
- pH-μέτρο.
- Μετρητής του διαλελυμένου οξυγόνου.
- Χάρτινοι ηθμοί.
- Συσκευή διηθήσεως με μεμβράνη.
- Μεμβράνες διηθήσεως, μεγέθους πόρου 0,45 μm. Οι μεμβράνες διηθήσεως είναι κατάλληλες εφόσον αποδεδειγμένα δεν αποδεσμεύουν άνθρακα ούτε απορροφούν την ουσία κατά το στάδιο της διηθήσεως.
- Αναλυτικός εξοπλισμός για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου οργανικού άνθρακα και της χημικής απαίτησης σε οξυγόνο.

- 1.6.1.3. **Παρασκευή του εμβολίου**
Η ενεργοποιημένη ιλύς που λαμβάνεται από σταθμό βιολογικής κατεργασίας εκπλύεται με τη βοήθεια (επανειλημμένων) φυγοκentrήσεων ή καθίζησης με νερό κατάλληλο για τη δοκιμασία (ανωτέρω). Η ενεργοποιημένη ιλύς πρέπει να είναι σε κατάλληλη κατάσταση. Τέτοια ιλύς μπορεί να ληφθεί από ένα σταθμό επεξεργασίας λυμάτων που λειτουργεί κανονικά. Προκειμένου η ποικιλία των βακτηριακών ειδών ή στελεχών να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερη, ίσως είναι προτιμότερο να αναμειγνύονται υλικά ενοφθαλμισμού διαφορετικής προέλευσης (π.χ. από διαφορετικούς σταθμούς κατεργασίας, δείγματα εδάφους, ποτάμια νερά κλπ.). Το μείγμα υφίσταται επεξεργασία όπως περιγράφεται ανωτέρω.
Για τον έλεγχο της δραστηριότητας της ενεργοποιημένης ιλύος βλέπε «Λειτουργικός έλεγχος» παρακάτω.
- 1.6.1.4. **Παρασκευή των διαλυμάτων της δοκιμασίας**
Στο δοχείο της δοκιμασίας προστίθενται 500 ml κατάλληλου για τη δοκιμασία νερού, 2,5 ml/1 ανόργανου θρεπτικού διαλύματος και ενεργοποιημένη ιλύς σε τιμή που αντιστοιχεί σε 0,2 έως 1,0 g/l ξηρής ύλης στο τελικό μείγμα. Προστίθεται επαρκώς ποσότητα αποδεδειγμένου διαλύματος της υπό δοκιμασία ουσίας μέχρις ότου επιτευχθεί στο τελικό μείγμα συγκέντρωση DOC 50 έως 400 mg/l. Οι αντίστοιχες τιμές COD είναι 100 έως 1 000 mg/l. Προστίθεται κατάλληλο για τη δοκιμασία νερό μέχρι τελικού συνολικού όγκου 1 έως 4 λίτρων. Ο καθορισμός του τελικού όγκου εξαρτάται από τον αριθμό των δειγμάτων που λαμβάνονται για προσδιορισμό του DOC ή του COD, καθώς και από τους όγκους που είναι αναγκαίοι για τη διεξαγωγή της ανάλυσης.
Συνήθως ένας όγκος δύο λίτρων μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητικός.
Σε κάθε σειρά δοκιμασιών ακολουθείται παράλληλη διαδικασία για ένα τουλάχιστον δοχείο-μάρτυρα (τυφή δοκιμασία). Το δοχείο αυτό περιέχει αποκλειστικά ενεργοποιημένη ιλύ και ανόργανο θρεπτικό διάλυμα, όπου προστίθεται κατάλληλο για τη δοκιμασία νερό μέχρι συνολικού όγκου ισοδύναμου με αυτόν των δοχείων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία.
- 1.6.2. **Διεξαγωγή της δοκιμασίας**
Το περιεχόμενο των δοχείων της δοκιμασίας αναδεύεται με μαγνητικούς αναδευτήρες ή έλικες υπό συνθήκες διάχυτου φωτισμού ή σε σκοτεινό θάλαμο σε θερμοκρασία 20 έως 25 °C. Ο αερισμός εξασφαλίζεται με τη διοχέτευση αέρα υπό πίεση ο οποίος καθαρίζεται με ηθμό από βαμβάκι ή και με φίλτρα εκπλύσεως, εφόσον αυτό είναι αναγκαίο. Πρέπει να εξασφαλιστεί ότι η ιλύς δεν θα καθιζάνει και ότι η συγκέντρωση του οξυγόνου δεν θα πέσει σε επίπεδα χαμηλότερα των 2 mg/l.
Η τιμή του pH πρέπει να ελέγχεται τακτικά (π.χ. καθημερινά) και εφόσον αυτό είναι αναγκαίο να διορθώνεται σε pH 7 έως 8.
Οι απόψεις από την εξέταση αναπληρώνονται πριν από κάθε δειγματοληψία με τις απαιτούμενες ποσότητες απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Μια καλή μέθοδος είναι να σημειώνεται η στάθμη του υγρού στο δοχείο πριν από την έναρξη της δοκιμασίας. Μετά από κάθε δειγματοληψία σημειώνεται η νέα στάθμη (χωρίς αερισμό και ανάδευση). Τα πρώτα δείγματα λαμβάνονται πάντοτε τρεις ώρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας προκειμένου να εντοπισθεί η προσρόφηση υλικού της δοκιμασίας από την ενεργοποιημένη ιλύ.
Η εξάλειψη του υλικού της δοκιμασίας απολυθείται από προσδιορισμούς DOC ή COD που διεξάγονται σε καθημερινή ή σε κάποια άλλη τακτική βάση. Τα δείγματα από το δοχείο της δοκιμασίας και από αυτό της τυφλής δοκιμασίας διηθούνται με τη βοήθεια προσεκτικά εκπλυθέντος χάρτινου ηθμού. Τα πρώτα 5 ml του διαλύματος-διηθήματος της δοκιμασίας απομακρύνονται. Οι ιλύες που είναι δύσκολο να διηθηθούν μπορούν να αφαιρεθούν προηγουμένως διά φυγοκentrήσεως επί 10 λεπτά. Οι προσδιορισμοί DOC και COD πραγματοποιούνται τουλάχιστον εις διπλούν. Η δοκιμασία διεξάγεται επί 28 ημέρες κατά μέγιστο όριο.
Σημείωση: Τα δείγματα που παραμένουν θολά διηθούνται με τη βοήθεια ηθμών από μεμβράνη. Οι ηθμοί από μεμβράνη πρέπει να μην αποδεσμεύουν ή προσροφούν οργανικές ύλες.
Λειτουργικός έλεγχος της ενεργοποιημένης ιλύος
Παράλληλα με κάθε σειρά δοκιμασιών πρέπει να διεξάγεται και μια δοκιμασία με δοχείο που περιέχει γνωστή ουσία, προκειμένου να ελέγχεται η λειτουργική αποδοτικότητα της ενεργοποιημένης ιλύος. Η διαθυλονογλικόλη έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμη για το σκοπό αυτό.
Προσαρμογή των μικροοργανισμών
Εφόσον τα χρονικά διαστήματα που μεσολαβούν μεταξύ των αναλύσεων είναι σχετικά μικρά (π.χ. εφόσον διεξάγονται καθημερινά), η προσαρμογή των μικροοργανισμών μπορεί να αναγνωριστεί σαφώς από την καμπύλη αποικοδομήσεως (βλέπε σχήμα 2). Κατά συνέπεια η δοκιμασία δεν πρέπει να αρχίζει αμέσως πριν το Σαββατοκύριακο.
Στην περίπτωση που η προσαρμογή πραγματοποιείται στο τέλος της περιόδου, η δοκιμασία μπορεί να παραταθεί μέχρις ότου περατωθεί η διάσπαση.
Σημείωση: Εφόσον απαιτείται ευρύτερη γνώση της συμπεριφοράς της ιλύος, η ίδια ενεργοποιημένη ιλύς εκτίθεται για άλλη μια φορά στο ίδιο υλικό της δοκιμασίας, σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:
Σταματάμε τη λειτουργία του αναδευτήρα και της συσκευής για την εισπνοή αέρα και αφήνουμε την ενεργοποιημένη ιλύ σε ηρεμία ώστε να καθιζάνει.
Απομακρύνουμε το επιπλέον υγρό, προσθέτουμε νερό της δοκιμασίας μέχρι τελικού όγκου δύο λίτρων, αναδεύουμε επί 15 λεπτά και αφήνουμε ξανά το σύστημα να ηρεμήσει. Μόλις απομακρυνθεί εκ νέου το επιπλέον υγρό χρησιμοποιείται ή εναπομένονσα ιλύς για να επαναληφθεί η δοκιμασία με το ίδιο υλικό σύμφωνα με τα σημεία 1.6.1.4 και 1.6.2. Η ενεργοποιημένη ιλύς μπορεί επίσης να απομονωθεί με φυγοκentrηση αντί της καθίζησης.
Η προσαρμοσμένη ιλύς μπορεί να αναμειχθεί με νωπή ιλύ μέχρι 0,2 έως 1 g βάρους ξηράς ουσίας/λίτρο κατά μέγιστο όριο.

Αναλυτικά μέσα

Κατά κανόνα τα δείγματα διηθούνται με τη βοήθεια προσεκτικά εκπλυθέντος χάρτινου ηθμού (για την έκπλυση χρησιμοποιείται αποιονισμένο νερό).

Τα δείγματα που παραμένουν θολά διηθούνται με τη βοήθεια μεμβρανών διηθήσεως (0,45 μm).

Η συγκέντρωση DOC προσδιορίζεται εις διπλούν στα διηθήματα του δείγματος (τα πρώτα 5 ml απομακρύνονται) με τη βοήθεια οργάνου TOC. Στην περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να υποβληθεί αυθημερόν σε ανάλυση το διήθημα, φυλάσσεται στο ψυγείο μέχρι την επομένη ημέρα. Η περαιτέρω φύλαξη δεν συνιστάται.

Η συγκέντρωση COD προσδιορίζεται στα διηθήματα δείγματος με τη βοήθεια των οργάνων μετρήσεως του COD, σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην παραπομπή (2), κατωτέρω.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Οι συγκεντρώσεις DOC και COD στα δείγματα προσδιορίζονται τουλάχιστον δύο φορές, σύμφωνα με το σημείο 1.6.2 ανωτέρω. Η αποικοδόμηση κατά τον χρόνο T υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο (με τους ορισμούς) που αναφέρεται στο σημείο 1.2 ανωτέρω.

Ο αριθμός που εκφράζει την έκταση της αποικοδόμησης στρωγγυλεύεται στην πλησιέστερη ακέραια εκατοστιαία μονάδα. Η αποικοδόμηση που έχει συντελεστεί στο τέλος της δοκιμασίας αποδίδεται ως «Βιοαποικοδομητικότητα στη δοκιμασία Zahn-Wellens».

Σημείωση: Στην περίπτωση που η αποικοδόμηση ολοκληρωθεί πριν από τη λήξη του χρόνου της δοκιμασίας, και το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιωθεί με δεύτερη ανάλυση που διενεργείται την επομένη, η δοκιμασία μπορεί να περατωθεί.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

- την αρχική συγκέντρωση της ουσίας,
- κάθε άλλη πληροφορία καθώς και τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν την υπό δοκιμασία ουσία, την ουσία αναφοράς—εφόσον χρησιμοποιείται— και αυτήν της τυφλής δοκιμασίας,
- τη συγκέντρωση μετά από τρεις ώρες,
- την καμπύλη βιοαποικοδόμησης, με περιγραφή,
- την ημερομηνία και τον τόπο δειγματοληψίας των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμασία, το βαθμό προσαρμογής, τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση κλπ.,
- τους επιστημονικούς λόγους της τυχόν μεταβολής της διαδικασίας της δοκιμασίας.

3.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η βαθμιαία απώλεια του DOC (COD) σε διάστημα ημερών ή εβδομάδων αποτελεί ένδειξη ότι η υπό δοκιμασία ουσία βιοαποικοδομείται.

Σε ορισμένες περιπτώσεις ωστόσο, η φυσικοχημική προσρόφηση μπορεί να διαδραματίσει κάποιο ρόλο και αυτό φαίνεται όταν σημειώνεται ολική ή επιμέρους απώλεια από την αρχή, εντός των τριών πρώτων ωρών, και η διαφορά μεταξύ επιπλέοντων υγρών μαρτύρων και αυτών της δοκιμασίας κυμαίνεται σε μη αναμενόμενα χαμηλά επίπεδα.

Για να γίνει διάκριση μεταξύ βιοαποικοδόμησης (ή μερικής βιοαποικοδόμησης) και προσρόφησης είναι αναγκαίο να διενεργούνται περαιτέρω δοκιμασίες.

Αυτό μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, ο εγκυρότερος των οποίων είναι να χρησιμοποιηθεί το επιπλέον υγρό ως υλικό εμβολιασμού σε βασική δοκιμασία (κατά προτίμηση σε δοκιμασία με αναπνοόμετρο).

Υπό δοκιμασία ουσίες με υψηλή απώλεια DOC (COD) που δεν οφείλεται σε προσρόφηση πρέπει να θεωρούνται ως ενδεχομένως βιοαποικοδομήσιμες. Η ύπαρξη μερικής, μη οφειλόμενης σε προσρόφηση απώλειας αποτελεί ένδειξη ότι η χημική ουσία υπόκειται τουλάχιστον σε κάποιας έκτασης βιοαποικοδόμηση. Η ύπαρξη χαμηλής ή μηδενικής απώλειας DOC (COD) μπορεί να οφείλεται σε ανασταλτική δράση της υπό δοκιμασία ουσίας στους μικροοργανισμούς, και αυτό μπορεί επίσης να διαπιστωθεί με τη λύση και την απώλεια ιλύος, γεγονός που οδηγεί σε θολά επιπλέοντα υγρά. Στη περίπτωση αυτή η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας ουσία χαμηλότερης περιεκτικότητας.

Η χρησιμοποίηση μιας ειδικής για τη συγκεκριμένη ένωση αναλυτικής μεθόδου ή σεσημασμένης με ^{14}C ουσίας της δοκιμασίας μπορεί να επιτρέψει την επίτευξη μεγαλύτερης ευαισθησίας.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμασία ένωση σεσημασμένη με ^{14}C , η ανάκτηση $^{14}\text{CO}_2$ θα επιβεβαιώσει ότι συντέλεστηκε βιοαποικοδόμηση.

Όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται σε πρωτογενή βιοαποικοδόμηση, πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να δοθεί κάποια εξήγηση για τη μεταβολή της χημικής δομής που οδηγεί σε έλλειψη ανταπόκρισως εκ μέρους της αρχικής ουσίας της δοκιμασίας.

Η κατοχύρωση της εγκυρότητας της αναλυτικής μεθόδου πρέπει να γίνεται μαζί με την ανταπόκριση που διαπιστώνεται σε μέσο όπου διεξάγεται τυφλή δοκιμασία.

4.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 302 B*, απόφαση του Συμβουλίου C(81)30 τελικό.
- (2) Παράρτημα V C.9 Αποικοδόμηση: Χημική απαίτηση σε οξυγόνο, οδηγία 84/449/ΕΟΚ της Επιτροπής, *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων* αριθ. L 251 της 19. 9. 1984.

Προσάρτημα

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΕΚΤΙΜΗΣΕΩΣ

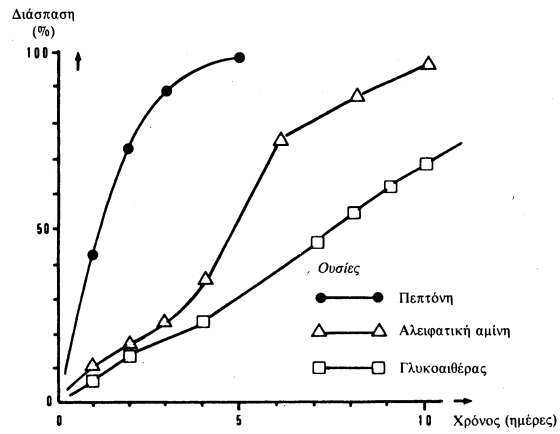
Οργανική ένωση:	4-Αιθοξυβενζοϊκό οξύ
Θεωρητική συγκέντρωση της δοκιμασίας:	600 mg/l
Θεωρητικός DOC:	390 mg/l
Υλικό εμβολιασμού:	Σταθμός κατεργασίας αποβλήτων . . .
Συγκέντρωση:	1 g ξηράς ουσίας λίτρο
Βαθμός προσαρμογής:	μη προσαρμοσμένη
Ανάλυση:	Προσδιορισμός DOC
Ποσότητα δείγματος:	3 ml
Ουσία-μάρτυρας:	Διαθειλενογλυκόλη
Τοξικότητα ενώσεως:	Δεν εμφανίζει τοξικότητα κάτω των 1 000 mg/l Χρησιμοποιούμενη δοκιμασία: Δοκιμασία ζυμώσεως σε σωλήνα

Χρόνος δοκιμασίας	Ουσία μάρτυρας				Ουσία δοκιμασίας		
	Τυφλό DOC (¹) mg/l	DOC (¹) mg/l	DOC καθαρό mg/l	Διάσπαση %	DOC (¹) mg/l	DOC καθαρό mg/l	Διάσπαση %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 ώρες	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 ημέρα	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 ημέρες	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 ημέρες	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 ημέρες	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 ημέρες	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 ημέρες	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 ημέρες	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 ημέρες	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(¹) Μέσες τιμές τριπλών προσδιορισμών.

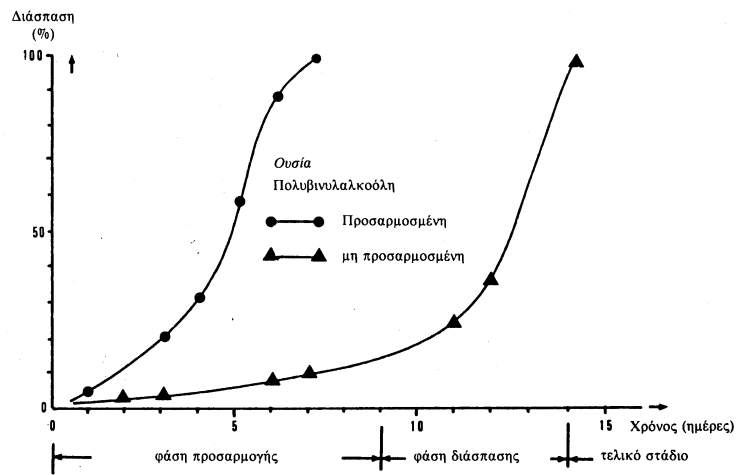
Σχήμα 1

Παραδείγματα καμπυλών βιοαποικοδόμησης



Σχήμα 2

Παραδείγματα προσαρμογής ιλύος



ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΡΟΣΟΜΙΩΣΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΙΛΥΟΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

1.1.1. Γενικές παρατηρήσεις

Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί μόνο για τις οργανικές ουσίες που, στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στην δοκιμασία:

- είναι υδατοδιαλυτές στο βαθμό που απαιτείται για την παρασκευή των διαλυμάτων ελέγχου,
- έχουν αμελητέα τάση ατμών στις συνθήκες της δοκιμασίας,
- δεν αναστέλλουν τα βακτηρίδια.

Οι πληροφορίες για τις σχετικές αναλογίες των κύριων συστατικών του υλικού ελέγχου θα είναι χρήσιμες για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που θα ληφθούν, ιδίως στις περιπτώσεις που τα αποτελέσματα είναι χαμηλά ή οριακά.

Οι πληροφορίες για την τοξικότητα της ουσίας στους μικροοργανισμούς κρίνονται επιθυμητές για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου.

1.1.2. Προσδιορισμός της τελικής βιοαποικοδομητικότητας (ανάλυση DOC/COD)

Σκοπός της μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της τελικής βιοαποικοδομητικότητας με μέτρηση της απομάκρυνσης της ουσίας και οποιωνδήποτε μεταβολιτών σε ένα μοντέλο εγκατάστασης ενεργοποιημένης ιλύος, σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε > 12 mg DOC/l (ή περίπου 40 mg COD/l). Τα 20 mg DOC/l θεωρούνται ως βέλτιστη συγκέντρωση. (DOC = διαλυμένος οργανικός άνθρακας, COD = χημική απαίτηση οξυγόνου).

Η περιεκτικότητα του υλικού ελέγχου σε οργανικό άνθρακα (ή η χημική απαίτηση οξυγόνου) πρέπει να καθορίζονται.

1.1.3. Προσδιορισμός της αρχικής βιοαποικοδομητικότητας (ειδική ανάλυση)

Σκοπός της μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της αρχικής βιοαποικοδομητικότητας μιας ουσίας σε ένα μοντέλο εγκατάστασης ενεργοποιημένης ιλύος, σε συγκέντρωση 20 mg/l περίπου, με τη βοήθεια ειδικής αναλυτικής μεθόδου (μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μεγαλύτερες ή μικρότερες συγκεντρώσεις αν το επιτρέπουν ή αναλυτική μεθοδος και η εκτίμηση της τοξικότητας). Με τον τρόπο αυτό μπορεί να υπολογιστεί η αρχική βιοαποικοδομητικότητα της ουσίας (εξαφάνιση της μητρικής χημικής δομής).

Σκοπός της μεθόδου αυτής δεν είναι ο προσδιορισμός της μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας σε ανόργανη.

Πρέπει να υπάρχει κατάλληλη αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

1.2.1. Ανάλυση DOC/COD

Ο βαθμός απομάκρυνσης της ουσίας δίνεται από τη σχέση:

$$DR = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100\% \quad [1 (a)]$$

όπου:

DR = βαθμός απομάκρυνσης σε % DOC (ή COD) μέσα στο δεδομένο μέσο χρόνο κατακράτησης σε σχέση με το υλικό ελέγχου,

T = συγκέντρωση του υλικού ελέγχου στο εισρέον υλικό, σε mg DOC/l (ή mg COD/l),

E = συγκέντρωση DOC (ή COD) στα απόβλητα της μονάδας ελέγχου, σε mg DOC/l (ή mg COD/l),

E₀ = συγκέντρωση DOC (ή COD) στα απόβλητα της μονάδας τυφλού προσδιορισμού σε mg DOC/l (ή mg COD/l).

Η αποικοδόμηση εκφράζεται ως το εκατοστιαίο ποσοστό απομάκρυνσης του DOC (ή COD) μέσα στο δεδομένο χρόνο κατακράτησης σε σχέση με το υλικό ελέγχου.

1.2.2. **Ειδική ανάλυση**

Η επί τοις εκατό απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας από την υδατική φάση (R_w) μέσα στο δεδομένο μέσο χρόνο κατακράτησης, δίνεται από τη σχέση:

$$R_w = \frac{C_i - C_o}{C_i} \times 100\% \quad [1 (B)]$$

όπου:

C_i = συγκέντρωση της ουσίας στο εισρέον υλικό της μονάδας ελέγχου (mg ουσίας/l, προσδιορίζεται με ειδική ανάλυση),

C_o = συγκέντρωση της ουσίας στα απόβλητα της μονάδας ελέγχου (mg ουσίας/l, προσδιορίζεται με ειδική ανάλυση).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Σε μερικές περιπτώσεις, κατά τον έλεγχο μιας νέας ουσίας, οι ουσίες αναφοράς μπορεί να είναι χρήσιμες, δεν είναι πάντως ακόμα δυνατόν να προταθούν συγκεκριμένες ουσίες αναφοράς.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Για τον προσδιορισμό της τελικής βιοαποικοδομητικότητας τίθενται σε παράλληλη λειτουργία δύο δοκιμαστικές μονάδες ενεργοποιημένης ιλύος (μονάδες δοκιμών επικύρωσης, ΟΟΣΑ, ή μονάδες πορώδους δοχείου). Η ελεγχόμενη ουσία προστίθεται στο υλικό που εισρέει στη μια από τις μονάδες (σύνθετικά ή οικιακά λύματα) ενώ η άλλη δέχεται μόνο τα λύματα. Για τον προσδιορισμό της αρχικής βιοαποικοδόμησης, με ειδική ανάλυση στο εισρέον υλικό και στα απόβλητα, χρησιμοποιείται μόνο μία μονάδα.

Μετριοούνται οι συγκεντρώσεις DOC (ή COD) στα απόβλητα ή προσδιορίζονται με ειδική ανάλυση οι συγκεντρώσεις της ουσίας.

Η περιεκτικότητα DOC που οφείλεται στο υλικό ελέγχου δεν μετρείται αλλά απλώς αναφέρεται.

Όταν διεξάγονται μετρήσεις DOC (ή COD), θεωρείται ότι η διαφορά στις μέσες συγκεντρώσεις μεταξύ των αποβλήτων ελέγχου και του μάρτυρα οφείλεται σε υλικό ελέγχου που δεν αποικοδομείται.

Όταν διεξάγονται ειδικές αναλύσεις μπορεί να μετρηθεί η μεταβολή στη συγκέντρωση του μητρικού μορίου (αρχική βιοαποικοδόμηση).

Οι μονάδες μπορούν να λειτουργήσουν με τη «μέθοδο των συζευγμένων μονάδων» με διαδικασία διανοφθαλμισμού.

1.5. **Ποιοτικά κριτήρια**

Η αρχική συγκέντρωση της ουσίας εξαρτάται από το είδος της ανάλυσης που διεξάγεται και τους περιορισμούς της.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

1.6.1. **Προετοιμασία**

1.6.1.1. **Εξοπλισμός**

Απαιτείται ζεύγος μονάδων του ίδιου τύπου εκτός από την περίπτωση που διεξάγονται ειδικές αναλύσεις. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο τύποι διατάξεων:

Δοκιμή επικύρωσης ΟΟΣΑ

Ο εξοπλισμός (προσάρτημα I) αποτελείται από δοχείο αποθήκευσης (A) για συνθετικά λύματα, αντλία δοσομετρική (B), δοχείο αερισμού (C), διαχωριστήρα (D), αντλία πεπιεσμένου αέρα (E) για την ανακύκλωση της ενεργοποιημένης ιλύος και δοχείο (F) για τη συλλογή των αποβλήτων μετά τον καθαρισμό.

Τα δοχεία (A) και (F) πρέπει να είναι γυάλινα ή από κατάλληλο πλαστικό και να έχουν χωρητικότητα τουλάχιστον 24 λίτρων. Η αντλία (B) πρέπει να παρέχει σταθερή ροή συνθετικών λυμάτων στο δοχείο αερισμού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε κατάλληλο σύστημα, με την προϋπόθεση ότι θα εξασφαλίζεται η ροή και η συγκέντρωση τροφοδότησης.

Κατά τη διάρκεια της κανονικής λειτουργίας, το ύψος του διαχωριστήρα (D) ρυθμίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε το δοχείο αερισμού να περιέχει όγκο τριών λίτρων ανεμειγμένου υγρού. Ένας πορώδης κύβος για αερισμό (G) αιωρείται στο δοχείο (C), στην κορυφή του κώνου. Η ποσότητα του αέρα που εμψυσάται μέσω του ανεμιστήρα μπορεί να ελέγχεται με τη βοήθεια ενός μετρητή ροής. Η αντλία πεπιεσμένου αέρα (E) ρυθμίζεται με τρόπο ώστε η ενεργός υδρ. από το διαχωριστήρα να ανακυκλώνεται συνεχώς και αρμονικά προς το δοχείο αερισμού (C).

«Πορώδες δοχείο»

Το πορώδες δοχείο είναι κατασκευασμένο από φύλλα πορώδους πολυαιθυλενίου (πάχος 2 mm, μέγιστο μέγεθος πόρων 95 μm) διαμορφωμένα σε κυλίνδρους διαμέτρου 14 cm με κωνική βάση στις 45° (σχήμα 1 και 2 του προσαρτήματος 2). Το πορώδες δοχείο περιέχεται σε αδιαπέραστο δοχείο από κατάλληλο πλαστικό με διάμετρο 15 cm και με μια έξοδο σε ύψος 17,2 cm στο κυλινδρικό μέρος, που καθορίζει τον όγκο (3 l) στο δοχείο. Γύρω από την κορυφή του εσωτερικού δοχείου υπάρχει άκαμπτος δακτύλιος στήριξης, κατασκευασμένος από κατάλληλο πλαστικό, ώστε να δημιουργείται διάστημα εκροής 0,5 cm ανάμεσα στο εσωτερικό και το εξωτερικό δοχείο.

Τα πορώδη δοχεία μπορούν να στερεωθούν στη βάση ενός θερμοστατούμενου υδατόλουτρου. Η παροχή αέρα γίνεται από τη βάση του εσωτερικού δοχείου, όπου έχουν τοποθετηθεί κατάλληλες διατάξεις διάχυσης.

Τα δοχεία (A) και (E) πρέπει να είναι γυάλινα ή από κατάλληλο πλαστικό και να έχουν χωρητικότητα τουλάχιστον 24 λίτρων. Η αντλία (B) πρέπει να παρέχει σταθερή ροή συνθετικών λυμάτων στο δοχείο αερισμού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε κατάλληλο σύστημα, με την προϋπόθεση ότι θα εξασφαλίζεται η ροή και η συγκέντρωση τροφοδότησης.

Απαιτούνται ανταλλακτικά εσωτερικά πορώδη δοχεία για την αντικατάσταση αυτών που τυχόν θα αποφραχθούν κατά τη χρήση. Τα δοχεία που αποφράζονται καθαρίζονται με εμβάπτιση σε υποχλωριώδες διάλυμα για 24 ώρες και κατόπιν καλό πλύσιμο με τρεχούμενο νερό.

1.6.1.2. Διήθηση

Απαιτούνται συσκευή διήθησης με μεμβράνες και διηθητικές μεμβράνες με μέγεθος πόρων 0,45 μm. Οι διηθητικές μεμβράνες θεωρούνται κατάλληλες αν εξασφαλίζεται ότι δεν ελευθερώνουν άνθρακα ούτε απορροφούν την ουσία κατά το στάδιο της διήθησης.

1.6.1.3. Λύματα

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε συνθετική τροφή είτε οικιακά λύματα.

Παράδειγμα συνθετικής τροφής

Σε κάθε λίτρο νερού της βρύσης διαλύονται:

Πεπτόνη:	160 mg,
Εκχύλισμα κρέατος:	110 mg,
Ουρία:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
CaCl ₂ ·2H ₂ O:	4 mg,
MgSO ₄ ·7H ₂ O:	2 mg,
K ₂ HPO ₄ :	28 mg.

Οικιακά λύματα

Θα πρέπει να είναι πρόσφατα, να συλλέγονται κάθε μέρα από το υπερχειλίσιμα της δεξαμενής προκαταρτισμού μιας εγκατάστασης καθαρισμού που επεξεργάζεται κυρίως οικιακά λύματα.

1.6.1.4. Μητρικό διάλυμα του υλικού ελέγχου

Παρασκευάζεται διάλυμα του υλικού ελέγχου, π.χ. 1%, για να προστεθεί στη μονάδα ελέγχου. Πρέπει να προσδιορίζεται η συγκέντρωση του υλικού ώστε να είναι γνωστός ο κατάλληλος όγκος που θα προστεθεί στα λύματα ή κατευθείαν στη μονάδα μέσω δεύτερης αντλίας για να επιτευχθεί η απαιτούμενη συγκέντρωση ελέγχου.

1.6.1.5. Εμβόλιο

Παρατήρηση: Όταν χρησιμοποιούνται οικιακά απόβλητα, δεν υπάρχει λόγος να χρησιμοποιείται εμβόλιο με χαμηλή βακτηριακή συγκέντρωση αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενεργοποιημένη υδρ.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα εμβόλια.

Δίνονται τρία παραδείγματα κατάλληλου ενοφθαλμίσματος:

α) Εμβόλια από δευτερογενή απόβλητα

Το εμβόλιο λαμβάνεται από δευτερογενή απόβλητα καλής ποιότητας που συλλέγονται από μια εγκατάσταση καθαρισμού που προορίζεται κυρίως για οικιακά λύματα. Τα απόβλητα πρέπει να διατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες κατά την περίοδο μεταξύ δειγματοληψίας και χρησιμοποίησής. Για την παρασκευή του εμβολίου το δείγμα διηθείται με χονδρό ημίδο και τα πρώτα 200 ml απορρίπτονται. Το διήθημα διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής. Απαιτούνται τουλάχιστον 3 ml για τον εμβολιασμό.

β) Σύνθετο εμβόλιο

Εμβόλιο από δευτερογενή απόβλητα:

Βλέπε περιγραφή παραπάνω.

Εμβόλιο από χώμα:

Σχηματίζεται εναίωρημα με 100 g από χώμα κήπου (γόνιμο, όχι στείρο) σε 1 000 ml πόσιμου νερού απαλλαγμένου από χλώριο. (Χώμα με εξαιρετικά μεγάλη αναλογία αργίλου, άμμου ή χούμου είναι ακατάλληλο.) Μετά την ανάδευση το εναίωρημα αφήνεται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο διηθείται με χονδρό ηθμό και τα πρώτα 200 ml απορρίπτονται. Το διήθημα αερίζεται αμέσως και μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής.

Εμβόλιο από επιφανειακά νερά

Ένα ακόμα μερικό εμβόλιο λαμβάνεται από μεσοσαπρόβια επιφανειακά νερά. Το δείγμα διηθείται με χονδρό ηθμό και τα πρώτα 200 ml απορρίπτονται. Το διήθημα διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής.

Ίσοι όγκοι από τα τρία αυτά μερικά δείγματα εμβολίου ενώνονται, αναμειγνύονται καλά και, από το μείγμα αυτό, λαμβάνεται το τελικό εμβόλιο.

Απαιτούνται τουλάχιστον 3 ml για το εμβόλιο.

γ) Εμβόλιο από ενεργοποιημένη ιλύ

Ένας όγκος (όχι περισσότερο από 3 l) ενεργοποιημένης ιλύος (περιεκτικότητα σε αιωρούμενα στερεά μέχρι 2,5 g/l) που έχει ληφθεί από τη δεξαμενή αερισμού μιας εγκατάστασης καθαρισμού οικιακών κυρίως λυμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ενοφθάλμιση.

1.6.2. Τρόπος εργασίας

Η δοκιμασία διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου που πρέπει να διατηρείται μεταξύ 18 °C και 25 °C.

Η δοκιμασία μπορεί να διεξαχθεί και σε χαμηλότερη θερμοκρασία (μέχρι 10 °C): αν η ουσία αποικοδομείται, τότε κανονικά δεν απαιτείται συνέχιση της εργασίας. Αν όμως η ουσία δεν έχει αποικοδομηθεί, η δοκιμασία πρέπει να πραγματοποιηθεί σε σταθερή θερμοκρασία μεταξύ 18 °C και 25 °C.

1.6.2.1. Περίοδος κανονικής λειτουργίας: Σχηματισμός ιλύος/σταθεροποίηση των μονάδων

Περίοδος ανάπτυξης της ιλύος/σταθεροποίησης είναι η περίοδος κατά την οποία συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών στην ενεργό ιλύ και η απόδοση των μονάδων οδηγούνται σε κατάσταση ισορροπίας στις συνθήκες λειτουργίας που εφαρμόζονται.

Περίοδος κανονικής λειτουργίας είναι η περίοδος που διαρκεί από το χρόνο της πρώτης προσθήκης της ελεγχόμενης ουσίας μέχρι το χρόνο που η απομάκρυνσή της φτάνει σε πλατό (σχετικά σταθερή τιμή). Η περίοδος αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει τις έξι εβδομάδες.

Η περίοδος αξιολόγησης διαρκεί τρεις εβδομάδες από τη στιγμή που η απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας φτάνει σε μια σχετικά σταθερή, και συνήθως υψηλή, τιμή. Για τις ουσίες που αποικοδομούνται λίγο ή καθόλου τις πρώτες έξι εβδομάδες, ως περίοδος αξιολόγησης λαμβάνονται οι επόμενες τρεις εβδομάδες.

Κατ' αρχήν γεμίζεται(ονται) η(οι) μονάδα(ες) που απαιτείται(ούνται) για μια δοκιμασία με το ενοφθάλμιση αναμειγμένο με εισρέον υλικό.

Ο ανεμιστήρας [και η αντλία πεπιεσμένου αέρα (E) στην περίπτωση των μονάδων δοκιμών επικύρωσης ΟΟΣΑ] καθώς και η διάταξη δΟΣΟΛΟΓΙΑΣ (B) μπαίνουν σε λειτουργία.

Το εισρέον υλικό χωρίς την ελεγχόμενη ουσία πρέπει να περνά μέσα από το δοχείο αερισμού (C) με ταχύτητα είτε ενός λίτρου ανά ώρα είτε μισού λίτρου ανά ώρα. Αυτό συνεπάγεται μέσο χρόνο κατακράτησης 3 ή 6 ώρες αντίστοιχα.

Η ταχύτητα αερισμού θα πρέπει να ρυθμίζεται έτσι ώστε το περιεχόμενο του δοχείου (C) να διατηρείται σταθερά σε αιώρηση ενώ η περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο να είναι τουλάχιστον 2 mg/l.

Πρέπει να εμποδίζεται το άφρισμα με κατάλληλα μέσα. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιαφριστικοί παράγοντες που δρουν παρεμποδιστικά στην ενεργοποιημένη ιλύ. Η ιλύς που συσσωρεύεται γύρω από την κορυφή του δοχείου αερισμού (C) [και, στην περίπτωση των μονάδων δοκιμών επικύρωσης ΟΟΣΑ, στη βάση του δοχείου καθίζησης (D) και στο κύκλωμα κυκλοφορίας] πρέπει να επαναφέρεται στο αναμειγμένο υγρό τουλάχιστον μία φορά την ημέρα με βούρτσισμα ή άλλο κατάλληλο τρόπο.

Όταν η ιλύς δεν καθίζει, η πυκνότητά της μπορεί να αυξηθεί με τον προσθήκη δόσεων των 2 ml από διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου 5%, όσες φορές χρειάζεται.

Τα απόβλητα συλλέγονται σε δοχείο (E ή F) επί 20 μέχρι 24 ώρες και λαμβάνεται δείγμα μετά από καλή ανάμειξη. Το δοχείο (E ή F) πρέπει να καθαρίζεται με προσοχή.

Για να ελέγχεται και να παρακολουθείται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, μετρείται, τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα, η χημική απαίτηση σε οξυγόνο (COD) ή ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) του διηθήματος από τα συσσωρευμένα απόβλητα καθώς και του διηθημένου εισρέοντος υλικού [με τη βοήθεια μεμβράνης με μέγεθος πόρων 45 μm, τα πρώτα 20 ml του διηθήματος (κατά προσέγγιση) απορρίπτονται].

Η μείωση του COD ή DOC θα πρέπει να είναι σταθερή όταν επιτυγχάνεται σχεδόν ομαλή καθημερινή αποικοδόμηση.

Η περιεκτικότητα σε ξηρή ύλη της ενεργοποιημένης ιλύος στη δεξαμενή αερισμού προσδιορίζεται δύο φορές την εβδομάδα (σε g/l). Οι μονάδες μπορούν να λειτουργούν με δύο τρόπους: είτε προσδιορίζεται δύο φορές την εβδομάδα η περιεκτικότητα της ενεργοποιημένης ιλύος σε ξηρή ύλη και, αν είναι μεγαλύτερη από 2,5 g/l, η περιεκτικότητα της ενεργοποιημένης ιλύος πρέπει να απορρίπτεται είτε 500 ml αναμειγμένου υγρού αφήνονται καθημερινά να διαρρέσουν από κάθε δοχείο ώστε να προκύψει μέσος χρόνος κατακράτησης της ιλύος για έξι ημέρες.

Όταν οι παράμετροι [αποτελεσματικότητα της διαδικασίας (σε απομάκρυνση DOC ή COD), συγκέντρωση της ιλύος, δυνατότητα καθίζησης της ιλύος, θολότητα των αποβλήτων κλπ.] που μετριοούνται και υπολογίζονται για τις δύο μονάδες είναι αρκετά σταθερές, η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να ενσωματωθεί στο εισρέον υλικό μιας από τις μονάδες, σύμφωνα με το σημείο 1.6.2.2.

Εναλλακτικός τρόπος είναι να προστεθεί η ελεγχόμενη ουσία στην αρχή της περιόδου ανάπτυξης της ιλύος (σημείο 1.6.2.1), ιδίως όταν η ιλύς προστίθεται ως ενοφθάλμιση.

1.6.2.2. Διαδικασία δοκιμασίας

Διατηρούνται οι συνθήκες λειτουργίας της περιόδου κανονικής λειτουργίας και προστίθεται στο εισρέον υλικό της μονάδας έλεγχου αρκετή ποσότητα μητρικού διαλύματος (περίπου 1 %) του υλικού ελέγχου ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του υλικού ελέγχου στα λύματα (περίπου 10 έως 20 mg DOC/l ή 40 mg COD/l). Αυτό μπορεί να γίνει με καθημερινή ανάμειξη του μητρικού διαλύματος με τα λύματα ή με τη βοήθεια χωριστού συστήματος άντλησης. Η επιθυμητή συγκέντρωση μπορεί να επιτευχθεί προοδευτικά. Αν η ελεγχόμενη ουσία δεν έχει τοξική επίδραση στην ενεργοποιημένη ιλύ μπορούν να ελεγχθούν και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Η μονάδα τυφλού προσδιορισμού τροφοδοτείται μόνο με εισρέον υλικό χωρίς την προσθήκη ουσιών. Λαμβάνονται για ανάλυση κατάλληλοι όγκοι από τα απόβλητα και διηθούνται με διηθητικές μεμβράνες (0,45 μm), ενώ τα πρώτα 20 ml του διηθήματος (κατά προσέγγιση) απορρίπτονται.

Τα διηθμένα δείγματα πρέπει να αναλύονται την ίδια ημέρα, διαφορετικά πρέπει να συντηρούνται με οποιαδήποτε κατάλληλη μέθοδο, για παράδειγμα, με τη χρησιμοποίηση 0,05 ml διαλύματος χλωριούχου υδραργύρου (HgCl₂) 1 % για κάθε 10 ml του διηθήματος ή με φύλαξη στους 2 έως 4 °C μέχρι 24 ώρες ή κάτω από τους - 18 °C για μεγαλύτερες περιόδους.

Ο χρόνος εισροής με την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας, δεν πρέπει να υπερβαίνει τις έξι εβδομάδες και η περίοδος αξιολόγησης θα πρέπει να είναι μικρότερη από τρεις εβδομάδες, δηλαδή για τον υπολογισμό του τελικού αποτελέσματος θα πρέπει να είναι διαθέσιμοι 14 έως 20 προσδιορισμοί.

Μέθοδος συζευγμένων μονάδων

Η σύζευξη των μονάδων γίνεται με ανταλλαγή ανάμεσα στις μονάδες 1,5 λίτρων αναμειγμένου υγρού (συμπεριλαμβανομένης και ιλύος) από τα δοχεία αερισμού της ενεργοποιημένης ιλύος, μια φορά την ημέρα. Σε περίπτωση υλικών ελέγχου με ισχυρή προσρόφηση, λαμβάνονται από τα δοχεία καθίζησης 1,5 λίτρα υπερκεκλιμένου υγρού μόνο που χύνονται στο δοχείο της ενεργοποιημένης ιλύος της άλλης μονάδας.

1.6.2.3. Ανάλυση

Για την παρακολούθηση της συμπεριφοράς της ουσίας μπορούν να γίνουν δύο είδη ανάλυσης:

DOC και COD

Οι συγκεντρώσεις DOC προσδιορίζονται εις διπλούν με τον αναλυτή άνθρακα ή/και τις τιμές COD σύμφωνα με την παραπομπή (2).

Ειδική ανάλυση

Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας προσδιορίζονται με κατάλληλη αναλυτική μέθοδο. Όταν είναι δυνατόν, θα πρέπει να γίνεται ειδικός προσδιορισμός της ουσίας που έχει προσροφηθεί στην ιλύ.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

2.1. Μέθοδος συζευγμένων μονάδων

Όταν χρησιμοποιείται η «μέθοδος συζευγμένων μονάδων», ο ημερήσιος βαθμός απομάκρυνσης DR υπολογίζεται σύμφωνα με το σημείο 1.2.1.

Οι τιμές αυτές για το βαθμό απομάκρυνσης DR διορθώνονται σε DRc για τη μεταφορά υλικού που οφείλεται στη διαδικασία διανοφθαλμισμού, με τη βοήθεια της εξίσωσης [2] ή της εξίσωσης [3] για μέσο χρόνο κατακράτησης τριών ή έξι ωρών αντίστοιχα.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Υπολογίζεται ο μέσος όρος της σειράς των τιμών DRc καθώς και η τυπική απόκλιση σύμφωνα με την εξίσωση [4]

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n-1}} \quad [4]$$

όπου:

S_{DRc} = τυπική απόκλιση της σειράς των τιμών DRc,

\overline{DRc} = μέση τιμή του DRc,

n = αριθμός προσδιορισμών.

Οι ακραίες τιμές της σειράς DRc απαλείφονται σύμφωνα με κατάλληλη στατιστική μέθοδο, π.χ. Νalimov [6], στη στάθμη πιθανότητας 95 % και υπολογίζονται πάλι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της απαλλαγμένης από τις ακραίες τιμές σειράς δεδομένων για το DRc.

Το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται με την εξίσωση [5].

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DRc} \quad [5]$$

όπου:

$t_{n-1;\alpha}$ = τιμή πίνακα του t για n ζεύγη τιμών E και E_0 και στατιστική εμπιστοσύνη P ($P = 1 - \alpha$) όπου P έχει οριστεί σε 95 % (1),

Το αποτέλεσμα αναφέρεται ως ο μέσος όρος με όρια ανοχής στη στάθμη εμπιστοσύνης 95 %, η αντίστοιχη τυπική απόκλιση, ο αριθμός των δεδομένων της απαλλαγμένης από τις ακραίες τιμές σειράς δεδομένων για το DRc και ο αριθμός των ακραίων τιμών, π.χ.:

$DRc = 98,6 \pm 2,3$ % απομάκρυνση DOC,

S = 4,65 % απομάκρυνση DOC,

n = 18,

x = αριθμός ακραίων τιμών.

2.2. Μέθοδος μη συζευγμένων μονάδων

Η απόδοση των μονάδων μπορεί να ελεγχθεί ως εξής:

$$\% \text{ απομάκρυνση COD ή DOC} = \frac{\text{COD ή DOC των λυμάτων} - \text{COD ή DOC των αποβλήτων των μονάδων}}{\text{COD ή DOC των λυμάτων}} \times 100$$

Η καθημερινή αυτή απομάκρυνση μπορεί να παρασταθεί γραφικά ώστε να αποκαλυφθούν διάφορες τάσεις, π.χ. εγκλιματισμού.

2.2.1. Χρησιμοποίηση των υπολογισμών COD/DOC

Ο ημερήσιος βαθμός απομάκρυνσης DR υπολογίζεται σύμφωνα με το σημείο 1.2.1.

Υπολογίζεται ο μέσος όρος της σειράς των τιμών DR καθώς και η τυπική απόκλιση σύμφωνα με την εξίσωση [6]

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

όπου:

S_{DR} = τυπική απόκλιση της σειράς των τιμών DR_i,

\overline{DR} = μέση τιμή του DR_i,

n = αριθμός προσδιορισμών.

Οι ακραίες τιμές της σειράς DR απαλείφονται σύμφωνα με κατάλληλη στατιστική μέθοδο, π.χ. Nalimov [6], στη στάθμη πιθανότητας 95 % και υπολογίζονται πάλι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της απαλλαγμένης από τις ακραίες τιμές σειράς δεδομένων για το DR.

Το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται με την εξίσωση [7] ως:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} s_{DR} \quad [7]$$

όπου:

$t_{n-1;\alpha}$ = τιμή πίνακα του t για n ζεύγη τιμών E και E₀ και στατιστική εμπιστοσύνη P (P = 1 - α), όπου P έχει οριστεί σε 95 % (1).

Το αποτέλεσμα αναφέρεται ως ο μέσος όρος με όρια ανοχής στη στάθμη εμπιστοσύνης 95 %, η αντίστοιχη τυπική απόκλιση, ο αριθμός των δεδομένων της απαλλαγμένης από τις ακραίες τιμές σειράς δεδομένων DR και ο αριθμός των ακραίων τιμών, π.χ.:

DR = (98,6 ± 2,3) % απομάκρυνση DOC,

S = 4,65 % απομάκρυνση DOC

n = 18,

x = αριθμός ακραίων τιμών.

2.2.2. Χρησιμοποίηση ειδικής ανάλυσης

Το ποσοστό απομάκρυνσης της ελεγχόμενης ουσίας από την υδατική φάση (R_w) υπολογίζεται σύμφωνα με το 1.2.2.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

- το έντυπο φύλλο που περιέχεται στο προσάρτημα 3 και δείχνει τις συνθήκες λειτουργίας για τη δοκιμασία,
- τον εξοπλισμό που επιλέχθηκε (δοκιμή επικύρωσης ΟΟΣΑ ή πορώδες δοχείο),
- τον τρόπο λειτουργίας που επιλέχθηκε: μέθοδος συζευγμένων μονάδων ή όχι,
- τα λύματα: συνθετικά ή οικιακά και, σε περίπτωση οικιακών λυμάτων, την ημερομηνία και τοποθεσία συλλογής,
- το εμβόλιο με την ημερομηνία και τοποθεσία δειγματοληψίας,
- δήλωση όπου περιγράφεται η αναλυτική μέθοδος, όταν διεξάγονται ειδικές αναλύσεις,
- γραφική παράσταση της απομάκρυνσης του DOC ή COD σε συνάρτηση με το χρόνο, τόσο για την περίοδο κανονικής λειτουργίας όσο και για την περίοδο αξιολόγησης,
- την αναλυτική ανάκτηση της ελεγχόμενης ουσίας σαν COD ή DOC στο μητρικό διάλυμα,
- αν έχουν γίνει ειδικές αναλύσεις, γραφική παράσταση του ποσοστού απομάκρυνσης της ελεγχόμενης ουσίας από την υδατική φάση σε συνάρτηση με το χρόνο (περίοδοι εισροής και αξιολόγησης),
- τη μέση απομάκρυνση του COD ή DOC ή της ελεγχόμενης ουσίας και την τυπική απόκλιση, όπως υπολογίζονται από τα αποτελέσματα της περιόδου αξιολόγησης, δηλαδή όταν παρουσιάζεται σταθερή απομάκρυνση του υλικού ελέγχου ή της περιόδου σταθερής λειτουργίας,
- γραφική παράσταση της συγκέντρωσης ενεργού υλός σε συνάρτηση με το χρόνο,
- οποιαδήποτε παρατήρηση σχετικά με την ενεργό ιλύ (απόρριψη περισσειούμενης υλός, συσσώρευση, FeCl₃ κλπ.),
- τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκε,
- οποιαδήποτε αποτελέσματα από αναλύσεις της υλός,
- όλες τις πληροφορίες και τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν την ελεγχόμενη ουσία και την ουσία αναφοράς, αν χρησιμοποιήθηκε,
- επιστημονική αιτιολόγηση οποιονδήποτε αλλαγών στη διαδικασία.

3.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η μικρή απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας από την υδατική φάση μπορεί να οφείλεται σε αναστολή των μικροοργανισμών από την ουσία. Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί επίσης να δειχθεί από λύση και απόλεια ιλύος, με συνέπεια θολό υπερκείμενο, και με ελάττωση της αποτελεσματικότητας της μονάδας πιλότου (ή προσομοίωσης) ως προς την απομάκρυνση του DOC (ή COD).

Συχνά παίζει ρόλο και η φυσικο-χημική προσρόφηση. Οι διαφορές μεταξύ της βιολογικής δράσης στο μόριο και της φυσικοχημικής προσρόφησης μπορούν να δειχθούν με ανάλυση της ιλύος μετά από ικανοποιητική αποβολή του προσροφημένου υλικού.

Απαιτούνται συμπληρωματικές δοκιμασίες αν πρέπει να γίνει διάκριση μεταξύ βιοαποικοδόμησης (ή μερικής βιοαποικοδόμησης) και προσρόφησης. Η διάκριση μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους, αλλά ο πιο πιστικός είναι να χρησιμοποιηθεί το υπερκείμενο σαν ενοφθάλμιμα σε μια δοκιμασία ρύθμισης βάσης (κατά προτίμηση δοκιμασία αναπνοομετρίας).

Αν παρατηρηθεί μεγάλη απομάκρυνση του DOC ή COD, αυτό οφείλεται σε βιοαποικοδόμηση, ενώ σε μικρή απομάκρυνση δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ βιοαποικοδόμησης και εξάλειψης. Για παράδειγμα, αν μια διαλυτή ένωση έχει υψηλή σταθερά προσρόφησης, της τάξης του 98%, και η ταχύτητα απόλεια της περισσευούμενης ιλύος είναι 10% την ημέρα, μπορεί να παρουσιαστεί απομάκρυνση μέχρι 40%. Με ταχύτητα διαρροής της περισσευούμενης ιλύος 30%, η απομάκρυνση που οφείλεται σε προσρόφηση στην ποσότητα της ιλύος και εξάλειψη μαζί με αυτή μπορεί να φθάσει μέχρι 65% (4).

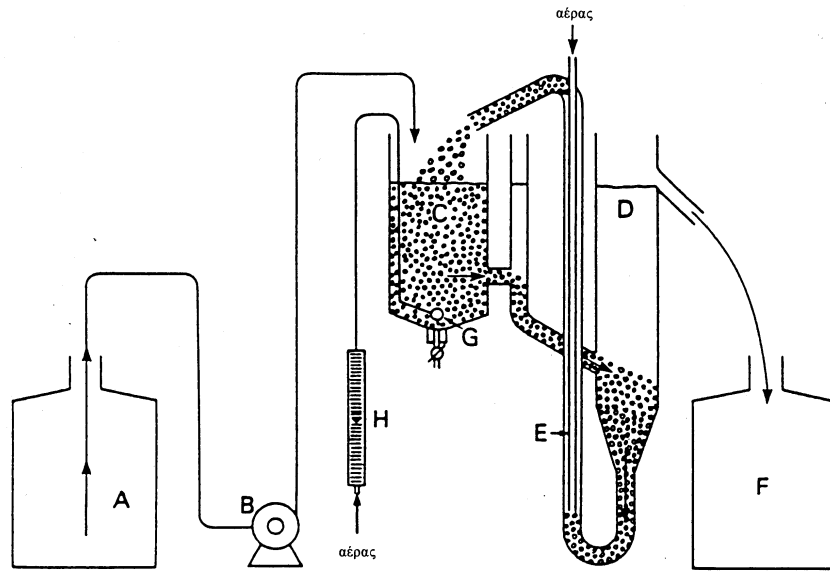
Όταν διεξάγεται ειδική ανάλυση θα πρέπει να δίνεται προσοχή στη σχέση ανάμεσα στη δομή της ουσίας και στην ειδική ανάλυση που γίνεται. Στην περίπτωση αυτή, το φαινόμενο που παρατηρείται δεν μπορεί να θεωρηθεί ως μετατροπή της ουσίας σε ανόργανη.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 303 A*, απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.
- (2) Παράρτημα V Γ9 Degradation Test — Chemical Oxygen Demand, οδηγία 84/449/ΕΟΚ της Επιτροπής, *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων* αριθ. L 251 της 19. 9. 1984.
- (3) Painter, H. A., King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, U.K.
- (4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, pp. 161-171.
- (5) Οδηγίες 82/242/ΕΟΚ και 82/243/ΕΟΚ του Συμβουλίου, *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων* αριθ. L 109 της 22. 4. 1982, για την τροποποίηση των οδηγιών 73/404/ΕΟΚ και 73/405/ΕΟΚ για την βιοαποικοδόμηση των απορρυπαντικών, *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων* αριθ. L 347 της 17. 12. 1973.
- (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Auswerttests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fesentus — Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), pp. 406-408.

Προσάρτημα 1

Σχήμα 1



Κλειδα:

A = Δοχείο αποθήκευσης

B = Δοσμετρική αντλία

C = Θάλαμος αερισμού (χωρητικότητα 3 l)

D = Δοχείο καθίζησης

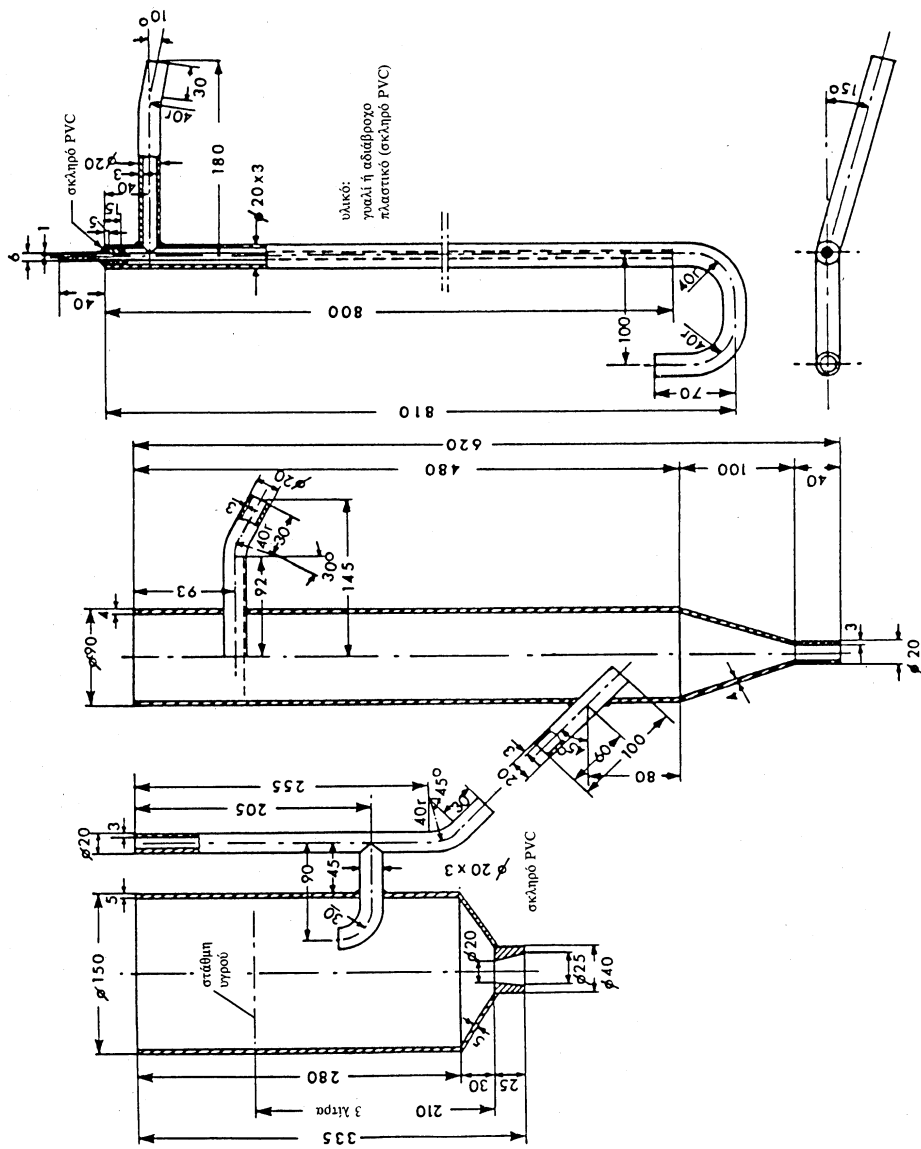
E = Πεπιεσμένος αέρας

F = Συλλέκτης

G = Ανεμιστήρας

H = Μετρητής ροής του αέρα (προαιρετικός).

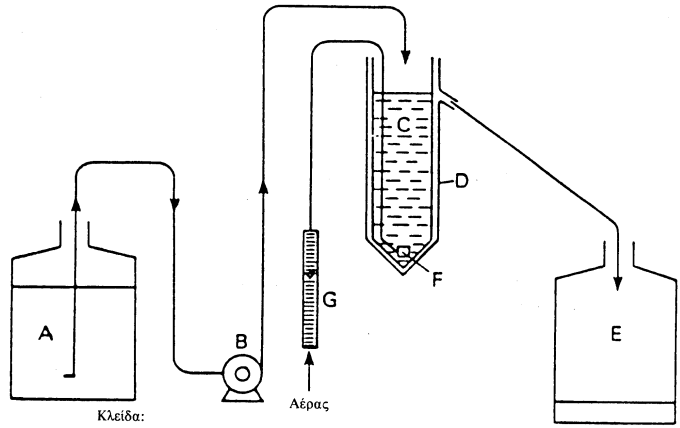
Σχήμα 2



Προσάρτημα 2

Σχήμα 1

Εξοπλισμός για τον υπολογισμό της βιοαποικοδομητικότητας



Κλειδα:

A = Δοχείο αποθήκευσης

B = Δοσομετρική αντλία

C = Πορώδες δοχείο αερισμού

D = Εξωτερικό αδιαπέραστο δοχείο

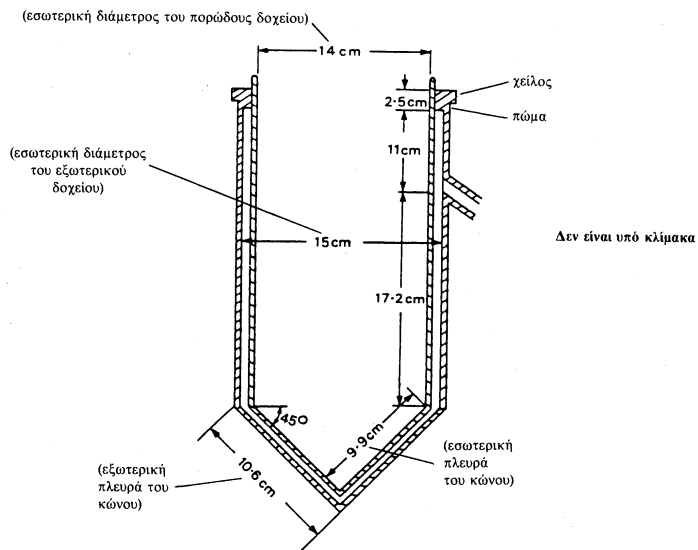
E = Δοχείο συλλογής αποβλήτων

F = Ανεμιστήρας με κύβο - Διάταξη διάχυσης

G = Δείκτης ροής (προαιρετικός)

Σχήμα 2

Λεπτομέρειες του πορώδους δοχείου αερισμού των 3 l



Προσάρτημα 3

Συνθήκες λειτουργίας για τη δοκιμασία προσομοίωσης ενεργοποιημένης ιλύος

Σημειώστε στην κάθε ομάδα

Συσκευή

Δοκιμή επικύρωσης ΟΟΣΑ
Πορώδες δοχείο

Τρόπος λειτουργίας

Μονή μονάδα
Συζευγμένες μονάδες
Μη συζευγμένες μονάδες

Διανοσθαλισμός

Ουδείς
Ενεργοποιημένη ιλύς
Υπερκείμενο

Χρόνος κατακράτησης

3 ώρες
6 ώρες

Βασικό υλικό δοκιμασίας

Οκτιακά λύματα
Συνθετικά λύματα

Εμβόλιο

Δευτερογενή απόβλητα
Σύνθετο
Ενεργοποιημένη ιλύς

Πρόσθεση υλικού δοκιμασίας

Από την αρχή
Προοδευτική αύξηση
Αφού η ιλύς έχει σχηματισθεί

Ανάλυση

Ειδική
COD
DOC

ΒΙΟΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΙΛΥΣ: ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Με τη μέθοδο που περιγράφεται εκτιμάται η επίδραση μιας ελεγχόμενης ουσίας στους μικροοργανισμούς με μέτρηση της ταχύτητας αναπνοής σε καθορισμένες συνθήκες, με την παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας.

Σκοπός της μεθόδου αυτής είναι να προσφέρει ταχεία μέθοδο εξέτασης με την οποία να είναι δυνατόν να αναγνωριστούν ουσίες που μπορεί να έχουν βλαπτική δράση σε εγκαταστάσεις αερόβιου μικροβιακού καθαρισμού και να προσδιοριστούν κατάλληλες μη ανασταλτικές συγκεντρώσεις των ελεγχόμενων ουσιών για να χρησιμοποιηθούν σε ελέγχους βιοαποικοδομησιμότητας.

Του οριστικού ελέγχου είναι δυνατόν να προηγηθεί δοκιμή προσδιορισμού περιοχής τιμών, η οποία παρέχει πληροφορίες για το εύρος των συγκεντρώσεων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στον καθαυτό έλεγχο.

Το πρωτόκολλο του ελέγχου περιλαμβάνει δύο μάρτυρες χωρίς την ελεγχόμενη ουσία, έναν αρχή και έναν στο τέλος της διαδικασίας ελέγχου. Θα πρέπει επίσης να ελέγχεται κάθε παρτίδα ενεργοποιημένης ιλύος με τη βοήθεια ουσίας αναφοράς.

Η μέθοδος αυτή ισχύει κατ' ελάχιστον για ουσίες που είναι πιθανόν να παραμείνουν στο νερό εξαιτίας της διαλυτότητάς τους στο νερό και της χαμηλής πτητικότητάς τους.

Για ουσίες με περιορισμένη διαλυτότητα στα υλικά ελέγχου, ίσως να μην είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η EC_{50} .

Τα αποτελέσματα που βασίζονται στην πρόσληψη οξυγόνου μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα όταν η ελεγχόμενη ουσία έχει την τάση να δρα σαν παράγοντας αποσύνθεσης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Για τη διεξαγωγή του ελέγχου είναι χρήσιμα τα ακόλουθα στοιχεία:

- διαλυτότητα στο νερό,
- τάση ατμών
- συντακτικός τύπος,
- καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας.

Σύσταση

Η ενεργοποιημένη ιλύς μπορεί να περιέχει ισχυρούς παθογόνους οργανισμούς και πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Ταχύτητα αναπνοής είναι η κατανάλωση του οξυγόνου των λυμάτων ή των μικροοργανισμών από την αερόβια ιλύ επεξεργασίας και εκφράζεται γενικά σε $mg O_2$ ανά mg ιλύος ανά ώρα.

Για να υπολογιστεί η ανασταλτική δράση μιας ελεγχόμενης ουσίας σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση, η ταχύτητα αναπνοής εκφράζεται ως επί τοις εκατό ποσοστό του μέσου όρου των ταχυτήτων αναπνοής των δύο μαρτύρων:

$$\left(1 - \frac{2R_2}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \text{τοις εκατό αναστολή}$$

όπου:

R_2 = ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου στη συγκέντρωση ελέγχου της ελεγχόμενης ουσίας,

RC_1 = ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου, μάρτυρας C_1 ,

RC_2 = ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου, μάρτυρας C_2 .

EC_{50} στη μέθοδο αυτή είναι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στην οποία η ταχύτητα αναπνοής είναι 50 % της ταχύτητας που δείχνουν οι μάρτυρες, στις συνθήκες που καθορίζονται στη μέθοδο.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Συνιστάται η χρησιμοποίηση της 3,5-διχλωροφαινόλης, γνωστού αναστολέα της αναπνοής, σαν ουσίας αναφοράς και ο έλεγχος της ουσίας αυτής για EC₅₀ σε κάθε παρτίδα ενεργού υλός ως μέσο πιστοποίησης ότι η ευαισθησία της υλός είναι κανονική.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Μετρείται η ταχύτητα αναπνοής ενεργού υλός, που τροφοδοτείται με πρότυπη ποσότητα θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα, μετά από περίοδο επαφής 30 λεπτών ή τριών ωρών, ή και τα δύο. Μετρείται επίσης η ταχύτητα αναπνοής της ίδιας ενεργού υλός παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας σε συνθήκες κατά τα άλλα όμοιες. Η ανασταλτική δράση της δοκιμαζόμενης ουσίας σε συγκεκριμένη συγκέντρωση εκφράζεται σαν επί τοις εκατό ποσοστό του μέσου όρου των ταχυτήτων αναπνοής των δύο μαρτύρων. Η τιμή της EC₅₀ υπολογίζεται από προσδιορισμούς σε διάφορες συγκεντρώσεις.

1.5. Ποιοτικά κριτήρια

Τα αποτελέσματα του ελέγχου είναι έγκυρα εφόσον:

- οι ταχύτητες αναπνοής στους δύο μάρτυρες απέχουν μεταξύ τους κατά 15 %,
- η EC₅₀ (30 λεπτά ή/και 3 ώρες) της 3,5-διχλωροφαινόλης κυμαίνεται μεταξύ των παραδεκτών ορίων 5 και 30 mg/l.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

1.6.1. Αντιδραστήρια

1.6.1.1. Διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας

Παρασκευάζονται πρόσφατα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας στην αρχή της μελέτης με τη βοήθεια μητρικού διαλύματος. Όταν ακολουθείται η διαδικασία που συνιστάται παρακάτω, κατάλληλη είναι μια συγκέντρωση μητρικού διαλύματος 0,5 g/l.

1.6.1.2. Διάλυμα της ουσίας αναφοράς

Μπορεί λόγω χάριν να παρασκευαστεί διάλυμα 3,5-διχλωροφαινόλης με διάλυση 0,5 g 3,5-διχλωροφαινόλης σε 10 ml NaOH 1M, αραιώση έως τα 30 ml περίπου με απεσταγμένο νερό, προσθήκη H₂SO₄ 0,5 M υπό ανάδευση μέχρι να εμφανιστεί ίζημα —θα απαιτηθούν περίπου 8 ml H₂SO₄ 0,5 M— και τέλος αραιώση του μείγματος έως το ένα λίτρο με απεσταγμένο νερό. Το pH θα πρέπει τότε να κυμαίνεται μεταξύ 7 και 8.

1.6.1.3. Συνθετικά απόβλητα

Παρασκευάζεται θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα με διάλυση των ακόλουθων ποσοτήτων ουσιών σε ένα λίτρο νερού:

- 16 g πεπτόνης,
- 11 g εκχυλίσματος,
- 3 g ουρίας,
- 0,7 g NaCl,
- 0,4 g CaCl₂·2H₂O,
- 0,2 g CaCl₂·7H₂O,
- 2,8 g K₂HPO₄.

Σημείωση 1: Τα συνθετικά αυτά απόβλητα είναι εκατό φορές πυκνότερα από αυτά που περιγράφονται στην τεχνική έκθεση του ΟΟΣΑ «Προτεινόμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της βιοαποικοδομησιμότητας των τασιενεργών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα συνθετικά απορρυπαντικά» (11 Ιουνίου 1976), με την προσθήκη οξίνου φωσφορικού καλίου.

Σημείωση 2: Στην περίπτωση που το παρασκευασθέν υλικό δεν χρησιμοποιηθεί αμέσως, φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 0 έως 4 °C, για διάστημα όχι μεγαλύτερο της μιας εβδομάδας, υπό συνθήκες που δεν προκαλούν οποιαδήποτε μεταβολή στη σύνθεσή του.

Το υλικό μπορεί επίσης να αποστειρωθεί πριν από τη φύλαξή του, ή μπορεί να γίνει η προσθήκη της πεπτόνης και του εκχυλίσματος κρέατος αμέσως πριν τη διεξαγωγή της δοκιμασίας. Πριν τη χρήση γίνεται πλήρης ανάμειξη και ρυθμίζεται το pH.

1.6.2. Συσκευές και όργανα

Συσκευή μέτρησης: Το ακριβές σχήμα δεν έχει μεγάλη σημασία. Πάντως, δεν πρέπει να υπάρχει υπερκείμενη αέρια φάση και το ηλεκτρόδιο θα πρέπει να εφαρμόζει στεγανά στο λαμό της φιάλης μετρήσεως.

Απαιτείται συνηθισμένος εργαστηριακός εξοπλισμός, και κυρίως τα εξής:

- συσκευή μέτρησης,
- διάταξη αερισμού,
- ηλεκτρόδιο και όργανο μέτρησης του pH,
- ηλεκτρόδιο οξυγόνου.

1.6.3. Παρασκευή του ενοφθαλμίσματος

Ως μικροβιακό ενοφθαλμίσμα για τον έλεγχο χρησιμοποιείται ενεργοποιημένη ιλύς από εγκατάσταση κατεργασίας αστικών κυρίως αποβλήτων.

Αφού φθάσει στο εργαστήριο η ιλύς, τα χοντρά σωματίδια μπορούν, αν χρειάζεται, να απομακρυνθούν, αφήνοντας το σύστημα σε ηρεμία για λίγο, παραδείγματος χάριν επί 15 λεπτά, και αποχύνεται η υπερκείμενη στιβάδα που αποτελείται από λεπτότερα σωματίδια, προς χρήση. Εναλλακτικά, η ιλύς μπορεί να αναμειχθεί με τη χρήση αναμεικτήρα για διάστημα μερικών δευτερολέπτων.

Εάν επιπλέον πιστεύεται ότι υπάρχει ανασταλτικό υλικό, η ιλύς πρέπει να πληθεί με νερό της βρύσης ή με ένα ισοτονικό διάλυμα. Μετά τη φυγοκέντρηση, αποχύνεται η υπερκείμενη στιβάδα (η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές).

Μικρή ποσότητα της ιλύος ζυγίζεται και ξηραίνεται. Από το αποτέλεσμα αυτό είναι δυνατόν να υπολογιστεί η ποσότητα υγρής ιλύος που πρέπει να εναωρηθεί σε νερό προκειμένου να ληφθεί ενεργοποιημένη ιλύς που θα περιέχει αιωρούμενα στερεά αναμειγμένα με υγρό σε ποσότητα μεταξύ 2 και 4 g/l. Το επίπεδο αυτό συνεπάγεται συγκέντρωση στο υλικό ελέγχου 0,8 έως 1,6 g/l, εφόσον ακολουθηθεί η παρακάτω συνιστώμενη διαδικασία.

Αν δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η ιλύς την ημέρα της συλλογής της, προστίθενται 50 ml συνθετικών αποβλήτων για κάθε λίτρο ενεργοποιημένης ιλύος που έχει παρασκευαστεί όπως προαναφέρθηκε. Το μείγμα αερίζεται όλη τη νύκτα στους 20 ± 2 °C. Στη συνέχεια διατηρείται υπό αερισμό για να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της ημέρας. Πριν χρησιμοποιηθεί ελέγχεται το pH του και ρυθμίζεται, αν χρειάζεται, μεταξύ 6,0 και 8,0. Τα αιωρούμενα στερεά του αναμειγμένου υγρού προσδιορίζονται όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο.

Αν η ίδια παρτίδα ιλύος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί τις επόμενες ημέρες (μέγιστο όριο τέσσερις ημέρες), στο τέλος κάθε εργάσιμης ημέρας προστίθενται ακόμα 50 ml θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα.

1.6.4. Διεξαγωγή της δοκιμασίας

Διάρκεια/περίοδος επαφής:	30 λεπτά ή/και τρεις ώρες, στη διάρκεια των οποίων γίνεται αερισμός
Νερό:	Πόσιμο νερό (αποχλωρωμένο αν χρειάζεται)
Παροχή αέρα:	Καθαρός αέρας απαλλαγμένος από έλαια. Ρεύμα αέρα 0,5 έως 1 λίτρο/λεπτό.
Συσκευή μέτρησης:	Φιάλη με επίπεδο πυθμένα όπως π.χ. φιάλη BOD
Μετρητής οξυγόνου:	Κατάλληλο ηλεκτρόδιο οξυγόνου με καταγραφέα
Θρεπτικό διάλυμα:	Συνθετικά απόβλητα (βλέπε παραπάνω)
Ελεγχόμενη ουσία:	Παρασκευάζεται πρόσφατο διάλυμα ελέγχου στην αρχή της δοκιμασίας
Ουσία αναφοράς:	Π.χ. 3,5 — διγλωροφαινόλη (τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις)
Μάρτυρες:	Ενοφθαλμισμένο δείγμα χωρίς ελεγχόμενη ουσία
Θερμοκρασία:	20 ± 2 °C

Στη συνέχεια περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που πρέπει να ακολουθείται τόσο για την ουσία αναφοράς όσο και για την ελεγχόμενη ουσία για την περίοδο επαφής των τριών ωρών:

Χρησιμοποιούνται πολλά δοχεία (π.χ. ποτήρια ζέσεως του 1 λίτρου).

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις που να διαφέρουν μεταξύ τους κατά σταθερό συντελεστή, κατά προτίμηση όχι μεγαλύτερο από 3,2.

Στο χρόνο «0», 16 ml θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα αραιώνονται έως τα 300 ml με νερό. Προστίθενται 200 ml μικροβιακού ενοφθαλμίσματος και το ολικό μείγμα (500 ml) φέρεται στο πρώτο δοχείο (πρώτος μάρτυρας C₁).

Τα δοχεία του ελέγχου πρέπει να αερίζονται συνεχώς, ώστε το επίπεδο του διαλυμένου O₂ να μην κατέρχεται κάτω των 2,5 mg/l και ώστε η συγκέντρωση του O₂, αμέσως πριν τη μέτρηση της ταχύτητας αναπνοής, να κυμαίνεται γύρω στα 6,5 mg/l.

Στο χρόνο «15 min» (τα 15 λεπτά είναι αυθαίρετο αλλά κατάλληλο χρονικό διάστημα) επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία, με τη διαφορά ότι προστίθενται 100 ml από το μητρικό διάλυμα της ελεγχόμενης ουσίας στα 16 ml συνθετικών αποβλήτων πριν από την προσθήκη νερού έως τα 300 ml και μικροβιακού εκχυλίσματος μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Το μείγμα αυτό φέρεται σε δεύτερο δοχείο και αερίζεται όπως προαναφέρθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται κατά διαστήματα των 15 λεπτών με διάφορους όγκους μητρικού διαλύματος της ελεγχόμενης ουσίας ώστε να ληφθεί σειρά δοχείων με διάφορες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Τέλος, παρασκευάζεται δεύτερος μάρτυρας (C₂).

Μετά τρεις ώρες μετρείται το pH, και ένα καλά αναμειγμένο δείγμα του περιεχομένου του πρώτου δοχείου μεταγγίζεται στη συσκευή μέτρησης και μετρείται η ταχύτητα αναπνοής για περίοδο 10 λεπτών το πολύ.

Ο προσδιορισμός αυτός επαναλαμβάνεται με το περιεχόμενο κάθε δοχείου ανά 15 λεπτά, έτσι ώστε η περίοδος επαφής να είναι τρεις ώρες για κάθε δοχείο.

Με τον ίδιο τρόπο ελέγχεται η ουσία αναφοράς σε κάθε παρτίδα μικροβιακού ενοφθαλμιάσματος.

Θα χρειασθεί διαφορετικό σύστημα (π.χ. περισσότεροι μετρητές οξυγόνου) αν πρόκειται να διεξαχθούν μετρήσεις μετά περίοδο επαφής 30 λεπτών.

Αν απαιτείται μέτρηση της χημικής κατανάλωσης οξυγόνου, ετοιμάζονται πρόσθετα δοχεία που περιέχουν ελεγχόμενη ουσία, θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα και νερό όχι όμως ενεργοποιημένη ιλύ. Η κατανάλωση οξυγόνου μετρείται και σημειώνεται μετά από περίοδο αερισμού 20 λεπτών ή/και τριών ωρών (περίοδος επαφής).

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η ταχύτητα αναπνοής υπολογίζεται από το σήμα του καταγραφέα σε mg O₂ ανά λίτρο και ανά ώρα στην περιοχή μεταξύ 6,5 mg O₂/l και 2,5 mg O₂/l περίπου ή για περίοδο 10 λεπτών όταν η ταχύτητα αναπνοής είναι χαμηλή. Το τμήμα της καμπύλης αναπνοής με βάση το οποίο μετρείται η ταχύτητα αναπνοής θα πρέπει να είναι ευθύγραμμο.

Αν οι ταχύτητες αναπνοής των δύο μαρτύρων απέχουν μεταξύ τους περισσότερο από 15% ή αν η EC₃₀ (30 λεπτά ή/και τρεις ώρες) της ουσίας αναφοράς δεν κυμαίνεται μεταξύ των παραδεκτών ορίων (5 και 30 mg/l για την 3,5-διγλωροφαινόλη), ο έλεγχος είναι άκυρος και πρέπει να επαναληφθεί.

Η επί τοις εκατό αναστολή υπολογίζεται σε κάθε συγκέντρωση ελέγχου (βλέπε σημείο 1.2). Η επί τοις εκατό αναστολή παριστάνεται γραφικά σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση, σε ημιλογαριθμικό χαρτί (ή ημιλογαριθμικό χαρτί πιθανότητας). Λαμβάνεται η τιμή EC₅₀.

Είναι δυνατόν να προσδιοριστούν όρια εμπιστοσύνης 95% για τις τιμές EC₅₀ με η βοήθεια πρότυπων μεθόδων.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

- Ελεγχόμενη ουσία: δεδομένα χημικής ταυτοποίησης.
- Σύστημα ελέγχου: πηγή, συγκέντρωση και οποιαδήποτε προκατεργασία της ενεργοποιημένης ιλύος.
- Συνθήκες ελέγχου:
 - pH του μείγματος της αντίδρασης πριν τη μέτρηση της αναπνοής,
 - θερμοκρασία ελέγχου,
 - διάρκεια του ελέγχου,
 - ουσία αναφοράς και την EC₅₀ που μετρήθηκε γι' αυτήν,
 - αβιοτική πρόσληψη οξυγόνου (αν διαπιστώθηκε).
- Αποτελέσματα:
 - όλα τα αποτελέσματα των μετρήσεων,
 - καμπύλη αναστολής και μέθοδο υπολογισμού της EC₅₀
 - EC₅₀ και, αν είναι δυνατόν, στάθμη εμπιστοσύνης 95%, EC₂₀ και EC₈₀,
 - όλες οι παρατηρήσεις και οποιαδήποτε παρέκκλιση από την παρούσα μέθοδο ελέγχου που θα μπορούσε να έχει επηρεάσει τα αποτελέσματα.

3.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η τιμή EC₅₀ θα πρέπει να θεωρείται απλός δείκτης της πιθανής τοξικότητας της δοκιμαζόμενης ουσίας είτε για την ενεργοποιημένη ιλύ κατεργασίας αποβλήτων είτε για τους μικροοργανισμούς των λυμάτων, δεδομένου ότι δεν είναι δυνατόν σ' ένα εργαστηριακό έλεγχο, να επιτευχθεί ακριβής προσομοίωση των σύνθετων αλληλεπιδράσεων που σημειώνονται στο περιβάλλον. Επιπλέον, δοκιμαζόμενες ουσίες που μπορούν να έχουν ανασταλτική δράση στην οξειδωση της αμμωνίας μπορούν να σχηματίσουν άτυπες καμπύλες αναστολής. Επομένως η ερμηνεία των καμπυλών αυτών πρέπει να γίνεται προσεκτικά.

4.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (1) Διεθνές πρότυπο ISO 8192-1986.
- (2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, σ. 165.
- (3) Brown, D., Hitz, H. R. and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, σ. 245.
- (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Μέθοδος που συνιστάται αριθ. 103*, η οποία περιγράφεται επίσης από τους:
- (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, σ. 80.
- (6) Schefer, W., *Textilveredlung*, 6, 1977, σ. 249.
- (7) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 209*, απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ SCAS

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Σκοπός της μεθόδου είναι η αξιολόγηση της ενδεχόμενης τελικής βιοαποικοδομησιμότητας υδατοδιαλυτών, μη πτητικών οργανικών ουσιών, όταν εκτίθενται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών εξασφαλίζεται με την καθημερινή προσθήκη διαυγασμένων λυμάτων ως υλικού τροφοδοσίας. (Για τις απαιτήσεις του Σαββατοκύριακου, τα λύματα μπορούν να φυλαχθούν στους 4 °C. Εναλλακτική δυνατότητα είναι η χρησιμοποίηση των συνθετικών λυμάτων της δοκιμασίας επιβεβαίωσης του ΟΟΣΑ.)

Είναι δυνατόν να σημειωθεί φυσικοχημική προσρόφηση των αιωρούμενων στερεών υλών, πράγμα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 3.2).

Εξαιτίας του μεγάλου χρόνου κατακράτησης της υγρής φάσης (36 ώρες) και της διακεκομμένης προσθήκης θρεπτικών υλικών, η δοκιμή δεν αποτελεί προσομοίωση των συνθηκών που απαντούν σε μια εγκατάσταση κατεργασίας λυμάτων. Τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με διάφορες ελεγχόμενες ουσίες δείχνουν ότι η δοκιμή διαθέτει υψηλό δυναμικό βιοαποικοδόμησης.

Οι συνθήκες που παρέχονται από τη δοκιμή είναι πολύ ευνοϊκές για την επιλογή ή/και την προσαρμογή μικροοργανισμών ικανών να αποικοδομήσουν την ελεγχόμενη ένωση. (Η δοκιμή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή εγκλιματισμένων ενοφθαλμιαμάτων για χρήση σε άλλες δοκιμές.)

Στη μέθοδο αυτή, η μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της τελικής βιοαποικοδομησιμότητας των ελεγχόμενων ουσιών. Είναι προτιμότερο να προσδιορίζεται η τιμή DOC μετά από οξίνιση και καθαρισμό παρά σαν διαφορά μεταξύ Σολικό — Canόργανο.

Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου μπορεί να επιτρέψει να εκτιμηθεί η αρχική αποικοδόμηση της ουσίας (εξαφάνιση της μητρικής χημικής σύνταξης).

Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί μόνο στις ελεγχόμενες οργανικές ουσίες, οι οποίες, στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στη δοκιμή:

- είναι διαλυτές στο νερό (τουλάχιστον 200 mg διαλυμένου οργανικού άνθρακα/l),
- έχουν αμελητέα τάση ατμών,
- δεν ασκούν ανασταλτική δράση στα βακτηρίδια,
- δεν προσροφώνται σημαντικά μέσα στο σύστημα ελέγχου,
- δεν παρουσιάζουν απώλειες μέσω αφρισμού από το διάλυμα ελέγχου.

Η περιεκτικότητα του ελεγχόμενου υλικού σε οργανικό άνθρακα πρέπει να είναι καθορισμένη.

Τα στοιχεία για τις σχετικές αναλογίες των κυριότερων συστατικών του ελεγχόμενου υλικού είναι χρήσιμο για την ερμηνεία των λαμβανόμενων αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις χαμηλών ή οριακών αποτελεσμάτων.

Τα στοιχεία για την τοξικότητα της ουσίας απέναντι στους μικροοργανισμούς μπορεί να είναι χρήσιμα για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και την επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης για τη δοκιμή.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

C_T = συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, εκφρασμένη σε οργανικό άνθρακα, όπως απαντά ή προστίθεται στα διαυγασμένα λύματα στην αρχή της περιόδου αερισμού (mg/l),

C_e = συγκέντρωση διαλυμένου οργανικού άνθρακα που βρίσκεται στο υπερκείμενο υγρό της μονάδας ελέγχου στο τέλος της περιόδου αερισμού (mg/l),

C_c = συγκέντρωση διαλυμένου οργανικού άνθρακα που βρίσκεται στο υπερκείμενο υγρό του μάρτυρα στο τέλος της περιόδου αερισμού (mg/l).

Στη μέθοδο αυτή, η βιοαποικοδόμηση ορίζεται ως η εξαφάνιση του οργανικού άνθρακα και μπορεί να εκφράζεται ως:

1. το επί τοις εκατό ποσοστό απομάκρυνσης D_{da} του ποσού της ουσίας που προστίθεται καθημερινά:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_i - C_e)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

όπου:

D_{da} = αποικοδόμηση/καθημερινή προσθήκη

2. το επί τοις εκατό ποσοστό απομάκρυνσης D_{ssd} του ποσού της ουσίας που υπάρχει στην αρχή κάθε ημέρας:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{i1} - C_{e1} - 3C_{i(i+1)} + 3C_{e(i+1)}}{2C_T + C_{i1} - C_{e1}} \times 100 \quad [2(\alpha)]$$

$$= \frac{2C_T - 2C(C_i - C_e)}{2C_T + (C_i - C_e)} \times 100 \quad [2(\beta)]$$

όπου:

D_{ssd} = αποικοδόμηση/ουσία στην αρχή της ημέρας

οι δείκτες i και $(i+1)$ αναφέρονται στην ημέρα της μέτρησης.

Η εξίσωση 2(α) συνιστάται στην περίπτωση που η τιμή DOC των αποβλήτων μεταβάλλεται από ημέρα σε ημέρα, ενώ η εξίσωση 2(β) μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν η τιμή DOC των αποβλήτων παραμένει σχετικά σταθερή από ημέρα σε ημέρα.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν μελετάται μια νέα ουσία, μπορεί να είναι χρήσιμες οι ουσίες αναφοράς παρ' όλα αυτά δεν συνιστάται στο παρόν έγγραφο καμιά ειδική ουσία αναφοράς.

Παρέχονται δεδομένα για πολλές ενώσεις που έχουν αξιολογηθεί με κυκλικές δοκιμές (βλέπε προσάρτημα 1), κυρίως για να μπορεί να γίνεται βαθμολόγηση της μεθόδου από καιρό σε καιρό και προκειμένου να επιτραπεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων όταν χρησιμοποιείται άλλη μέθοδος.

1.4. Αρχή της μεθόδου ελέγχου

Σε μονάδα ενεργοποιημένης ιλύος ημισυνεχούς λειτουργίας (SCAS) τοποθετείται ενεργοποιημένη ιλύς από εγκατάσταση κατεργασίας λυμάτων. Προτίθενται η ελεγχόμενη ουσία και οικιακά λύματα που έχουν υποστεί καθίζηση και το μείγμα αερίζεται για 23 ώρες. Στη συνέχεια παύει ο αερισμός, η ιλύς αφήνεται να καθιζάνει και το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται.

Η ιλύς που παραμένει στο θάλαμο αερισμού αναμιγνύεται κατόπιν με νέο κλάσμα ελεγχόμενης ουσίας και λυμάτων και ο κύκλος επαναλαμβάνεται.

Η βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται με προσδιορισμό της περιεκτικότητας του υπερκείμενου υγρού σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα. Η τιμή αυτή συγκρίνεται με την τιμή που βρίσκεται για το υγρό που λαμβάνεται από ένα σωλήνα μάρτυρα, στον οποίο έχουν προστεθεί μόνο διαγασμένα λύματα.

Όταν χρησιμοποιείται ειδική αναλυτική μέθοδος, μπορούν να μετρηθούν οι μεταβολές στη συγκέντρωση του μητρικού μορίου που οφείλεται στη βιοαποικοδόμηση (αρχική βιοαποικοδομισιμότητα).

1.5. Ποιοτικά κριτήρια

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου αυτής, που βασίζεται στην απομάκρυνση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα, δεν έχει ακόμη αποδειχθεί. (Όταν εξετάζεται η αρχική βιοαποικοδόμηση, λαμβάνονται δεδομένα μεγάλης ακριβείας για υλικό που βιοαποικοδομείται σε μεγάλο βαθμό.)

Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις διακυμάνσεις του τυφλού και, σε μικρότερη έκταση, από την ακρίβεια στον προσδιορισμό του διαλυμένου οργανικού άνθρακα καθώς και από τα επίπεδα της ελεγχόμενης ένωσης στο υγρό στην αρχή κάθε κύκλου.

1.6. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας

1.6.1. Προετοιμασία

Συναρμολογείται επαρκής αριθμός καθαρών μονάδων αερισμού (εναλλακτική δυνατότητα είναι η χρησιμοποίηση της πρωτότυπης μονάδας ελέγχου SCAS των 1,5 l) και σωλήνων εισαγωγής του αέρα (σχήμα 1) για κάθε ελεγχόμενη ουσία και για τους μάρτυρες. Ο συμπιεσμένος αέρας, που διοχετεύεται στις μονάδες ελέγχου, αφού καθαριστεί με τη βοήθεια ηθμού από φαρμακευτικό βαμβάκι, πρέπει να είναι απαλλαγμένος από οργανικό άνθρακα και να έχει προηγουμένως κορεσθεί με νερό ώστε να ελαττωθούν οι απώλειες που οφείλονται σε εξάτμιση.

Από εγκατάσταση ενεργοποιημένης ιλύος, που επεξεργάζεται κυρίως αστικά λύματα, λαμβάνεται δείγμα ανάμεικτου υγρού με περιεκτικότητα 1 έως 4 g αιωρούμενων στερεών. Για κάθε μονάδα αερισμού απαιτούνται κατά προσέγγιση 150 ml ανάμεικτου υγρού.

Παρασκευάζονται μητρικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας σε απεσταγμένο νερό απαιτείται συνήθως συγκέντρωση 400 mg/l σε οργανικό άνθρακα, που δίνει συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας 20 mg/l σε οργανικό άνθρακα στην αρχή κάθε κύκλου αερισμού, εφόσον δεν σημειώνεται καθόλου βιοαποικοδόμηση.

Επιτρέπονται και υψηλότερες συγκεντρώσεις, εφόσον το επιτρέπει η τοξικότητα απέναντι στους μικροοργανισμούς. Μετράται η περιεκτικότητα των μητρικών διαλυμάτων σε οργανικό άνθρακα.

1.6.2. Συνθήκες της δοκιμής

Η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται στους 20 έως 25 °C.

Χρησιμοποιείται υψηλή συγκέντρωση αεροβίων μικροοργανισμών (από 1 έως 4 g/l αιωρούμενων στερεών υλών) και ο πραγματικός χρόνος κατακράτησης είναι 36 ώρες. Το ανθρακούχο υλικό στα λύματα τροφοδότησης οξειδώνεται εξαντλητικά, συνήθως μέσα σε οκτώ ώρες μετά την έναρξη κάθε κύκλου αερισμού. Στη συνέχεια, η ιλύς αναπνέει ενδογενώς για το υπόλοιπο της περιόδου αερισμού, διάστημα κατά το οποίο το μόνο διαθέσιμο υπόστρωμα είναι η ελεγχόμενη ένωση, εκτός εάν και αυτή μεταβολίζεται εύκολα. Τα χαρακτηριστικά αυτά, σε συνδυασμό με τον καθημερινό επανεμβολιασμό του ελέγχου με εμβόλιο από αστικά λύματα, παρέχουν εξαιρετικά ευνοϊκές συνθήκες τόσο για εγκλιματισμό όσο και για μεγάλους βαθμούς βιοαποικοδόμησης.

1.6.3. Εκτέλεση της δοκιμασίας

Λαμβάνεται δείγμα ανάμεικτου υγρού από κατάλληλη εγκατάσταση ενεργοποιημένης ιλύος επεξεργασίας αστικών κυρίως λυμάτων ή εργαστηριακή μονάδα και διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες μέχρι να χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο. Σε κάθε μονάδα αερισμού καθώς και στη μονάδα μάρτυρα μεταφέρονται 150 ml (όταν χρησιμοποιείται η πρωτότυπη μονάδα ελέγχου SCAS, να πολλαπλασιάζονται οι αναφερόμενοι όγκοι επί 10) ανάμεικτου υγρού και αρχίζει ο αερισμός. Μετά από 23 ώρες ο αερισμός σταματάει και η ιλύς αφήνεται να καθιζάνει για 45 λεπτά. Ανοίγεται η στρόφιγγα κάθε δοχείου με τη σειρά και αφαιρούνται ποσότητες 100 ml από το υπερκείμενο υγρό. Λαμβάνεται η δείγμα διαυγασμένων αστικών λυμάτων αμέσως πριν από τη χρήση και 100 ml από αυτό προστίθενται στην ιλύ που έχει απομείνει σε κάθε μονάδα αερισμού. Αρχίζει πάλι ο αερισμός. Στο στάδιο αυτό δεν προστίθενται ελεγχόμενα υλικά και οι μονάδες τροφοδοτούνται καθημερινά μόνο με αστικά λύματα, μέχρι να ληφθεί καθαρό υπερκείμενο υγρό μετά την καθίζηση. Η διαδικασία αυτή απαιτεί συνήθως δύο εβδομάδες, στο τέλος των οποίων ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας που περιέχεται στο υπερκείμενο υγρό στο τέλος κάθε κύκλου αερισμού πλησιάζει μια σταθερή τιμή.

Στο τέλος της περιόδου αυτής αναμειγνύονται οι επιμέρους διαυγασμένες ιλύες και σε κάθε μονάδα προστίθενται 50 ml της προκύπτουσας σύνθετης ιλύος.

Στις μονάδες μάρτυρες προστίθενται 100 ml διαυγασμένων λυμάτων, ενώ στις μονάδες ελέγχου 95 ml συν 5 ml από το κατάλληλο μητρικό διάλυμα της ελεγχόμενης ουσίας (400 mg/l). Αρχίζει πάλι ο αερισμός, που συνεχίζεται για 23 ώρες. Η ιλύς αφήνεται κατόπιν να καθιζάνει για 45 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται και αναλύεται για την περιεκτικότητά του σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα.

Η παραπάνω διαδικασία πλήρωσης και αφαίρεσης επαναλαμβάνεται καθημερινά σε όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας.

Πριν από την καθίζηση είναι πιθανόν να χρειαστεί καθαρισμός των τοιχωμάτων των μονάδων, ώστε να αποτραπεί η συσσώρευση στερεών υλών πάνω από τη στάθμη του υγρού. Για κάθε μονάδα χρησιμοποιείται διαφορετικό ξέστρο ή ψήκτρα, ώστε να αποφευχθεί η αλληλομόλυνση.

Θεωρητικά, ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας στα υπερκείμενα υγρά προσδιορίζεται καθημερινά, παρόλο που επιτρέπονται και λιγότερο συχνές αναλύσεις. Πριν από την ανάλυση, τα υγρά διηθούνται μέσω διηθητικών μεμβρανών των 0,45 μm, που έχουν υποστεί έκπλυση ή φυγοκεντρώνονται. Οι διηθητικές μεμβράνες είναι κατάλληλες, εφόσον εξασφαλίζεται ότι δεν ελευθερώνουν άνθρακα ούτε προσροφούν την ουσία στο στάδιο της διήθησης. Η θερμοκρασία του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 40 °C, όταν αυτό βρίσκεται στη φυγόκεντρο.

Η διάρκεια της δοκιμασίας για ουσίες που παρουσιάζουν μικρή ή δεν παρουσιάζουν καθόλου βιοαποικοδόμηση είναι απροσδιόριστη, αλλά από την πείρα προκύπτει ότι θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 12 εβδομάδες κατά κανόνα, όχι όμως μεγαλύτερη από 26 εβδομάδες.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Χαράσσεται καμπύλη των τιμών του διαλυμένου οργανικού άνθρακα στα υπερκείμενα υγρά των μονάδων ελέγχου και των μονάδων μάρτυρων συναρτήσει του χρόνου.

Όταν ολοκληρώνεται η βιοαποικοδόμηση, τα επίπεδα που βρίσκονται στη μονάδα ελέγχου τείνουν να πλησιάζουν τα επίπεδα του μάρτυρα. Μόλις διαπιστωθεί ότι η διαφορά μεταξύ των δύο επιπέδων είναι σταθερή επί τρεις διαδοχικές μετρήσεις, εκτελούνται τόσες περαιτέρω μετρήσεις όσες αρκούν για να επιτρέψουν τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και υπολογίζεται η επί τοις εκατό βιοαποικοδόμηση της ελεγχόμενης ένωσης (D_{ca} ή D_{sd} , βλέπε σημείο 1.2).

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση των αποτελεσμάτων της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει:

- κάθε πληροφορία για το είδος των λυμάτων, τον τύπο της μονάδας που χρησιμοποιήθηκε και τα πειραματικά αποτελέσματα σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, την ουσία αναφοράς, εφόσον χρησιμοποιήθηκε, και τον τυφλό προδιορισμό,
- τη θερμοκρασία,
- την καμπύλη απομάκρυνσης με περιγραφή, του τρόπου υπολογισμού (βλέπε σημείο 1.2),
- την ημερομηνία και την τοποθεσία της δειγματοληψίας για την ενεργοποιημένη ιλύ και τα λύματα, την κατάσταση προσαρμογής, τη συγκέντρωση κλπ.,
- τους επιστημονικούς λόγους για τυχόν αλλαγές στην πειραματική διαδικασία,
- υπογραφή και ημερομηνία.

3.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Δεδομένου ότι η ουσία που πρόκειται να ελεγχθεί με τη μέθοδο αυτή δεν μπορεί εύκολα να βιοαποικοδομηθεί, οποιαδήποτε απομάκρυνση DOC οφειλόμενη αποκλειστικά σε βιοαποικοδόμηση θα είναι κανονικά σταδιακή σε διάστημα ημερών ή εβδομάδων, εκτός από τις περιπτώσεις κατά τις οποίες εκδηλώνεται αιφνίδιος εγκλιματισμός, πράγμα που φαίνεται από μια ραγδαία εξαφάνιση μετά από μερικές εβδομάδες.

Η φυσικοχημική ωστόσο προσρόφηση μπορεί μερικές φορές να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο: αυτό φαίνεται με την πλήρη ή μερική απομάκρυνση του DOC που έχει προστεθεί στην αρχή. Το τι θα συμβεί κατόπιν εξαρτάται από παράγοντες όπως οι βαθμοί προσρόφησης και η συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών στα απόβλητα που αποχύνονται. Συνήθως, η διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων DOC στα υπερκείμενα υγρά του μάρτυρα και της μονάδας ελέγχου αυξάνεται σταδιακά από την αρχικά χαμηλή τιμή και η διαφορά αυτή παραμένει κατόπιν στα νέα επίπεδα για το υπόλοιπο μέρος του πειράματος, εκτός αν συμβεί εγκλιματισμός.

Για να γίνει διάκριση ανάμεσα στη βιοαποικοδόμηση (ή τη μερική βιοαποικοδόμηση) και την προσρόφηση απαιτούνται περισσότερα πειράματα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, ο πιο πιστικός όμως είναι να χρησιμοποιηθεί το υπερκείμενο υγρό ή η ιλύς ως ενοφθάλμισμα σε μια δοκιμασία βασικής σειράς (base-set test) (κατά προτίμηση δοκιμασία αναπνοομετρίας).

Οι ελεγχόμενες ουσίες που παρουσιάζουν μεγάλη, μη οφειλόμενη σε προσρόφηση απομάκρυνση του DOC στη δοκιμασία αυτή, θα πρέπει να θεωρούνται ως ισχυρά βιοαποικοδομήσιμες. Η μερική, μη οφειλόμενη σε προσρόφηση απομάκρυνση δείχνει ότι η χημική ένωση επιδέχεται βιοαποικοδόμηση τουλάχιστον ως ένα βαθμό.

Η χαμηλή ή μηδενική απομάκρυνση DOC μπορεί να οφείλεται σε αναστολή των μικροοργανισμών από την ελεγχόμενη ουσία, και αυτό μπορεί επίσης να φανεί με τη λύση και την απώλεια ιλύος, που οδηγεί σε θολά υπερκείμενα υγρά. Η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί με χαμηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας.

Η χρήση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου ή σημασμένης ελεγχόμενης ουσίας με ισότοπο ^{14}C μπορεί να επιτρέψει μεγαλύτερη ευαισθησία. Στην περίπτωση ελεγχόμενης ουσίας με ^{14}C , η ανάκτηση του $^{14}\text{CO}_2$ επιβεβαιώνει ότι έχει σημειωθεί βιοαποικοδόμηση.

Όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται σε αρχική βιοαποικοδόμηση, θα πρέπει, αν είναι δυνατόν, να επεξηγηθεί η αλλαγή στη χημική σύνταξη, που οδηγεί σε απώλεια της απόκρισης της μητρικής ελεγχόμενης ουσίας.

Η εγκυρότητα της αναλυτικής μεθόδου πρέπει να αναφέρεται μαζί με την απόκριση της κατά τον προσπορισμό της στον τυφλό έλεγχο.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1982, *Test Guideline 302 A*, απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

Προσάρτημα 1

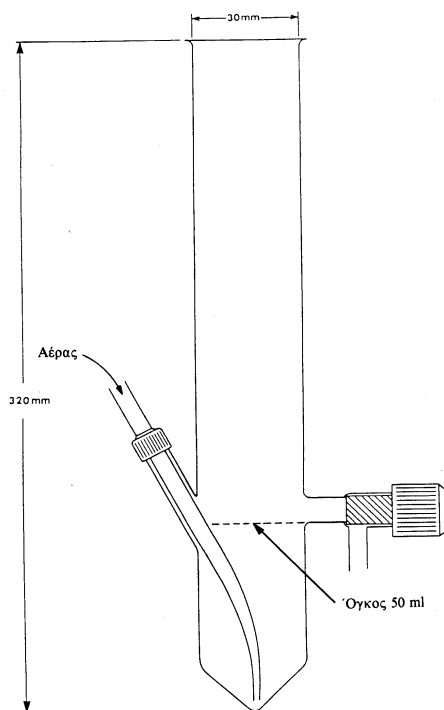
Δοκιμασία SCAS: παράδειγμα αποτελεσμάτων

Ουσία	C_T (mg/l)	$C_T - C_c$ (mg/l)	Εκατοστιαίο ποσοστό βιοαποικοδόμησης D_{25}	Διάρκεια δοκιμασίας (ημέρες)
Θεικό άλας του 4-ακετυλο-αμινοβενζολίου	17,2	2,0	85	40
Θεικό άλας του τετρα-προπυλενο-βενζολίου	17,3	8,4	51,4	40
4-Νιτροφαινόλη	16,9	0,8	95,3	40
Διαθυλενογλυκόλη	16,5	0,2	98,8	40
Ανιλίνη	16,9	1,7	95,9	40
Τετρα-καρβοξυλικό άλας του κυκλοπεντανίου	17,9	3,2	81,1	120

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα συσκευής δοκιμασίας

Σχήμα 1



C.13 ΒΙΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ: ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΨΑΡΙΑ ΜΕ ΣΥΝΕΧΗ ΡΟΗ ΝΕΡΟΥ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μέθοδος αυτή βιοσυγκέντρωσης αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 305 (1996).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη μέθοδο αυτή περιγράφεται διαδικασία για τον προσδιορισμό της δυναμικότητας βιοσυγκέντρωσης ουσιών σε ψάρια υπό συνθήκες συνεχούς ροής νερού. Αν και η διαδικασία της δοκιμής υπό συνεχή ροή νερού είναι κατά πολύ προτιμώτερη, επιτρέπεται η χρήση και ημιστατικών διαδικασιών υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.

Η μέθοδος περιλαμβάνει επαρκή στοιχεία για την εκτέλεση της δοκιμής, αφήνοντας ταυτόχρονα ικανή ελευθερία για την προσαρμογή του σχεδιασμού του πειράματος στις συνθήκες που επικρατούν στα διάφορα εργαστήρια και στα ποικίλα χαρακτηριστικά των προς δοκιμή ουσιών. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα έγκυρη στην περίπτωση σταθερών οργανικών χημικών ουσιών με τιμές $\log P_{ow}$ μεταξύ 1,5 και 6,0 (1), μπορεί όμως να εφαρμοστεί και σε υπερλιπόφιλες ουσίες (με τιμή $\log P_{ow} > 6,0$). Η τιμή του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης ($\Sigma B\Sigma$), ο οποίος μερικές φορές συμβολίζεται με K_B , για τις υπερλιπόφιλες αυτές ουσίες, είναι υποθετικά, όταν γίνεται εκ των προτέρων εκτίμηση αυτής, υψηλότερη από την τιμή του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση ($\Sigma B\Sigma_{σκ}$) που αναμένεται να βρεθεί από τα εργαστηριακά πειράματα. Προεκτιμήσεις του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης για οργανικές χημικές ουσίες με τιμές $\log P_{ow}$ μέχρι περίπου 9,0 μπορούν να γίνουν χρησιμοποιώντας την εξίσωση των Bintein et al (2). Στις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν τη δυναμικότητα βιοσυγκέντρωσης περιλαμβάνεται η σταθερά ρυθμού πρόσληψης (k_1), η σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) και ο ($\Sigma B\Sigma_{σκ}$).

Η ανάλυση δειγμάτων νερού και ψαριών μπορεί να διευκολυνθεί με ραδιοϊχνηθετημένες υπό δοκιμή ουσίες αφού αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαπιστωθεί αν θα πρέπει να γίνει ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός προϊόντων αποικοδόμησης. Εάν γίνει μέτρηση του συνόλου των ραδιενεργών υπολειμμάτων (π.χ. με καύση ή διαλυτοποίηση των ιστών), ο $\Sigma B\Sigma$ βασίζεται στη γονική ουσία, σε τυχόν κατακρατούμενους μεταβολίτες καθώς επίσης και σε τυχόν αφομοιωμένο άνθρακα. Επομένως, τιμές $\Sigma B\Sigma$ που βασίζονται στο σύνολο των ραδιενεργών υπολειμμάτων δεν μπορούν να συγκριθούν απευθείας με τιμές $\Sigma B\Sigma$ που προέρχονται από ειδική χημική ανάλυση μόνον των γονικών ουσιών.

Στις μελέτες με ραδιοϊχνηθετημένες ουσίες, για τον προσδιορισμό του $\Sigma B\Sigma$ που βασίζεται στη γονική ένωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ορισμένες διαδικασίες καθαρισμού, ενώ, εφόσον θεωρηθεί αναγκαίο, μπορούν να εντοπιστούν και οι βασικοί μεταβολίτες. Επίσης, είναι δυνατόν να γίνει ένας συνδυασμός μελέτης μεταβολισμού ψαριών με μελέτη βιοσυγκέντρωσης με ανάλυση και ταυτοποίηση των υπολειμμάτων στους ιστούς.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Βιοσυγκέντρωση/βιοσυσσώρευση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας σε ένα ή επί ενός οργανισμού (σε συγκεκριμένους ιστούς του) σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο.

Συντελεστής βιοσυγκέντρωσης ($\Sigma B\Sigma$ ή K_B) σε οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης της δοκιμής αυτής συσσωρεύσης είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα/επί των ψαριών ή συγκεκριμένους ιστούς τους (C_f σε $\mu\text{g/g}$ (ppm)) διηρημένη δια της συγκεντρώσεως της χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_w σε $\mu\text{g/ml}$ (ppm)).

Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σταθερής κατάστασης ($\Sigma B\Sigma_{σκ}$ ή K_B) δεν αλλάζει σημαντικά για μία παρατεταμένη χρονική περίοδο, ενώ ταυτόχρονα η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσον είναι σταθερή κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου.

Σταθερή κατάσταση στη γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια (C_f) συναρτήσει του χρόνου επιτυγχάνεται όταν η καμπύλη καθίσταται παράλληλη με τον άξονα του χρόνου και τρεις διαδοχικοί προσδιορισμοί της C_f σε δείγματα ληφθέντα ανά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους σε ποσοστό μεγαλύτερο από $\pm 20\%$, χωρίς όμως να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιόδων δειγματοληψίας. Όταν αναλύονται συγκεντρωτικά δείγματα, απαιτούνται τουλάχιστον τέσσερις διαδοχικές αναλύσεις. Στην περίπτωση προς δοκιμή ουσιών που προσλαμβάνονται με αργό ρυθμό, τα διαστήματα αντιστοιχούν κατά προτίμηση σε επτά ημέρες.

Συντελεστές βιοσυγκέντρωσης που υπολογίζονται απ' ευθείας από σταθερές ρυθμού κινητικής (k_1/k_2) χαρακτηρίζονται ως συντελεστές συγκέντρωσης κινητικής, $\Sigma B_{\Sigma k}$.

Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (P_{ow}) είναι ο λόγος της διαλυτότητας μίας χημικής ουσίας σε η-οκτανόλη και νερό σε κατάσταση ισορροπίας (Μέθοδος Α.8), συμβολιζόμενος επίσης και ως K_{ow} . Ο λογάριθμος του P_{ow} χρησιμοποιείται ως ένδειξη της δυνητικότητας βιοσυγκέντρωσης μίας χημικής ουσίας σε υδρόβιους οργανισμούς.

Έκθεση ή φάση πρόσληψης είναι ο χρόνος κατά την διάρκεια του οποίου τα ψάρια εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία.

Σταθερά ρυθμού πρόσληψης (k_1) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό αύξησης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα/επί των υπό δοκιμή ψαριών (ή σε συγκεκριμένους ιστούς τους) όταν τα ψάρια εκτίθενται στη χημική αυτή ουσία (η k_1 εκφράζεται σε ημέρα⁻¹).

Φάση μετα-έκθεσης ή αποβολής (απώλειας) είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο, έπειτα από τη μεταφορά των υπό δοκιμή ψαριών από ένα μέσο που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία σε μέσο απηλλαγμένο της ουσίας αυτής, μελετάται η αποβολή (ή η καθαρή απώλεια) της ουσίας από τα υπό δοκιμή ψάρια (ή τους συγκεκριμένους ιστούς τους).

Σταθερά ρυθμού αποβολής (απώλειας) (k_2) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό της μείωσης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα υπό δοκιμή ψάρια (ή τους συγκεκριμένους ιστούς τους) μετά τη μεταφορά των υπό δοκιμή ψαριών από μέσο που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία σε μέσο απηλλαγμένο της ουσίας αυτής (η k_2 εκφράζεται σε ημέρα⁻¹).

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή αποτελείται από δύο φάσεις: Τη φάση της έκθεσης (πρόσληψης) και τη φάση της μετα-έκθεσης (αποβολής). Κατά τη διάρκεια της φάσης της πρόσληψης, ξεχωριστές ομάδες ψαριών ενός είδους εκτίθενται σε δύο τουλάχιστον συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας. Κατόπιν, οι ομάδες των ψαριών μεταφέρονται σε μέσο απηλλαγμένο της υπό δοκιμή ουσίας για τη φάση της αποβολής. Η φάση της αποβολής χρειάζεται οπωσδήποτε εκτός κι αν η πρόσληψη της ουσίας κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης είναι ασήμαντη (π.χ. ο $\Sigma B_{\Sigma k}$ είναι μικρότερος του 10). Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα/επί των ψαριών (ή τους συγκεκριμένους ιστούς τους) παρακολουθείται κατά τη διάρκεια και των δύο φάσεων της δοκιμής. Εκτός από τις δύο αυτές ομάδες, μία ομάδα-μάρτυρας ψαριών διατηρείται υπό τις ίδιες συνθήκες εκτός της απουσίας της υπό δοκιμή ουσίας για να γίνει συσχετισμός πιθανών δυσμενών επιδράσεων που παρατηρούνται στη δοκιμή βιοσυγκέντρωσης με μία αντίστοιχη ομάδα-μάρτυρα και για να βρεθούν τυχόν προϋπάρχουσες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας.

Η φάση της πρόσληψης διαρκεί 28 ημέρες εκτός κι αν αποδεδειγμένα επιτευχθεί νωρίτερα ισορροπία. Μία πρόβλεψη ως προς τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης και τον χρόνο επίτευξης σταθερής κατάστασης μπορεί να γίνει με την εξίσωση του παραρτήματος 3. Κατόπιν αρχίζει η περίοδος αποβολής με μεταφορά των ψαριών στο ίδιο μέσο αλλά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία σε άλλο καθαρό δοχείο. Εφόσον είναι δυνατό, ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης υπολογίζεται κατά προτίμηση τόσο ως ο λόγος ($\Sigma B_{\Sigma k}$) της συγκέντρωσης στα ψάρια (C_f) και στο νερό (C_w) σε φαινομενική σταθερή κατάσταση όσο και ως συντελεστής κινητικής βιοσυγκέντρωσης, $\Sigma B_{\Sigma k}$, δηλ. ως ο λόγος των σταθερών ρυθμού πρόσληψης (k_1) και αποβολής (k_2), υποτιθεμένου ότι η κινητική είναι πρώτης τάξεως. Εάν είναι προφανές ότι η κινητική δεν είναι πρώτης τάξεως, τότε πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο περίπλοκα μοντέλα (παράρτημα 5).

Εάν μέσα σε 28 ημέρες δεν επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, η φάση της πρόσληψης θα πρέπει να παρατείνεται μέχρις ότου επιτευχθεί σταθερή κατάσταση ή μέχρι 60 ημέρες, όποιο από τα δύο συμβεί πρώτο, κατόπιν δε αρχίζει η φάση της αποβολής.

Η σταθερά ρυθμού πρόσληψης, η σταθερά ρυθμού αποβολής (απώλειας) (ή οι σταθερές, αν χρησιμοποιούνται πιο πολύπλοκα μοντέλα), ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης και, όπου είναι δυνατόν, τα όρια εμπιστοσύνης καθεμιάς από τις παραμέτρους αυτές υπολογίζονται από το μοντέλο που περιγράφει καλύτερα τις μετρούμενες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια και το νερό.

Ο $\Sigma B_{\Sigma k}$ εκφράζεται ως συνάρτηση του συνολικού υγρού βάρους των ψαριών. Εντούτοις, για ειδικούς λόγους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και συγκεκριμένοι ιστοί ή όργανα (π.χ., μυς, σπλάκνι), εάν τα ψάρια είναι αρκετά μεγάλα ή μπορούν να χωριστούν σε εδώδιμα (φιλέτο) και μη εδώδιμα (εντόσθια) τμήματα. Δεδομένου ότι στην περίπτωση πολλών οργανικών ουσιών υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ δυνητικότητας βιοσυγκέντρωσης και λιποφιλικότητας, υπάρχει και αντίστοιχη σχέση μεταξύ του λιπιδικού περιεχομένου των υπό δοκιμή ψαριών και της παρατηρούμενης βιοσυγκέντρωσης των ουσιών αυτών. Έτσι, για την υποβάθμιση της πηγής αυτής διαφορών στα αποτελέσματα δοκιμών σε ουσίες με υψηλή λιποφιλικότητα (δηλ. με $\log P_{ow} > 3$), η βιοσυγκέντρωση θα πρέπει να εκφράζεται, πέραν του συνολικού σωματικού βάρους, και σε σχέση με το λιπιδικό περιεχόμενο.

Το λιπιδικό περιεχόμενο θα πρέπει να προσδιορίζεται στο ίδιο βιολογικό υλικό με εκείνο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, όταν είναι εφικτό.

1.4 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

Πριν να πραγματοποιηθεί η δοκιμή για τη βιοσυγκέντρωση, θα πρέπει να είναι γνωστά τα ακόλουθα στοιχεία για την ουσία:

- α) Υδατοδιαλυτότητα
- β) Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού P_{ow} (συμβολιζόμενος επίσης και ως K_{ow} και προσδιοριζόμενος με μέθοδο HPLC στο Α.8)
- γ) Υδρόλυση
- δ) Φωτομετασηματισμός στο νερό προσδιορισμένος υπό ηλιακή ή προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία και υπό τις συνθήκες ακτινοβολίας στη δοκιμή για τη βιοσυγκέντρωση (3)
- ε) Επιφανειακή τάση (δηλ. για ουσίες στις οποίες δεν μπορεί να προσδιοριστεί ο $\log P_{ow}$)
- ζ) Τάση ατμών
- η) Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (όπου ενδείκνυται)

Άλλα απαιτούμενα στοιχεία είναι η τοξικότητα για το είδος των ψαριών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή, κατά προτίμηση η ασυμπτωτική LC_{50} (δηλ. ανεξάρτητα του χρόνου). Πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη κατάλληλη αναλυτική μέθοδος, γνωστής ορθότητας (accuracy), ακρίβειας (precision) και ευαισθησίας, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή ουσίας στα διαλύματα δοκιμής και σε βιολογικό υλικό, καθώς και στοιχεία για την παρασκευή και αποθήκευση του δείγματος. Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστό το αναλυτικό όριο ανίχνευσης της προς δοκιμή ουσίας τόσο στο νερό όσο και στους ιστούς των ψαριών. Όταν για τη δοκιμή χρησιμοποιείται επισημασμένη με C^{14} ουσία, θα πρέπει να είναι γνωστό το ποσοστό της ραδιενέργειας που οφείλεται σε προσμείξεις.

1.5 ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για να είναι έγκυρη μία δοκιμή, θα πρέπει να επικρατούν οι ακόλουθες συνθήκες:

- Η διακύμανση στη θερμοκρασία να είναι μικρότερη από $\pm 2^{\circ}\text{C}$
- Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου να μην πέφτει κάτω από το 60% της συγκέντρωσης κορεσμού
- Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στους θαλάμους να διατηρείται στο $\pm 20\%$ του μέσου όρου των τιμών που μετρώνται κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης
- Η θνησιμότητα ή άλλα δυσμενή φαινόμενα/ασθένειες τόσο στα ψάρια-μάρτυρες όσο και στα ψάρια της δοκιμής να είναι μικρότερη του 10% στο τέλος της δοκιμής. Όταν η δοκιμή παρατείνεται για κάποιες εβδομάδες ή μήνες, η θνησιμότητα ή άλλα δυσμενή φαινόμενα και στις δύο σειρές ψαριών θα πρέπει να είναι μικρότερη από 5% το μήνα και να μην υπερβαίνει το 30% συνολικά.

1.6 ΕΝΩΣΕΙΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για τον έλεγχο, εφόσον απαιτείται, της πειραματικής διαδικασίας μπορεί να είναι χρήσιμη η χρησιμοποίηση ενώσεων αναφοράς γνωστής δυναμικότητας βιοσυγκέντρωσης. Εντούτοις, δεν μπορούν ακόμη να γίνουν συστάσεις για κάποιες συγκεκριμένες ουσίες.

1.7 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.7.1 Εξοπλισμός

Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να αποφεύγεται η χρήση υλικών, σε οποιοδήποτε τμήμα του εξοπλισμού, τα οποία μπορεί να διαλυθούν, προσροφηθούν ή αποπλυθούν και να έχουν δυσμενή επίδραση στα ψάρια. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθεις ορθογώνιες ή κυλινδρικές δεξαμενές, κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και με κατάλληλη χωρητικότητα ανάλογα με το ρυθμό πληρώσεως. Θα πρέπει να αποφεύγεται όσο το δυνατόν η χρήση μαλακών πλαστικών σωληνώσεων. Προτιμάται η χρήση σωληνώσεων από τεφλόν (R), ανοξείδωτο χάλυβα και/ή γυαλί. Η εμπειρία έχει δείξει ότι στην περίπτωση ουσιών με μεγάλους συντελεστές προσροφήσεως, όπως τα συνθετικά πυρεθροειδή, μπορεί να απαιτείται η χρήση σιλιανιωμένου γυαλιού. Στις περιπτώσεις αυτές ο εξοπλισμός, μετά τη χρήση, πρέπει να απορρίπτεται.

1.7.2 Νερό

Στις δοκιμές χρησιμοποιείται γενικά φυσικό νερό το οποίο όμως πρέπει να λαμβάνεται από πηγές που να μην είναι μολυσμένες και να παρέχουν νερό ομοιόμορφης ποιότητας. Το νερό για τις αραιώσεις πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε το επιλεγμένο είδος ψαριού να μπορεί να επιβιώσει καθ' όλη τη διάρκεια του εγκλιματισμού και της δοκιμής χωρίς να παρουσιάζει οποιαδήποτε ανώμαλη εμφάνιση ή συμπεριφορά. Η ιδανική περίπτωση θα ήταν να μπορεί να αποδεικνύεται ότι το είδος αυτό του ψαριού μπορεί να επιζήσει, να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί στο νερό της αραιώσης (π.χ. με καλλιέργεια στο εργαστήριο ή με δοκιμή τοξικότητας για τον κύκλο της ζωής του). Το νερό θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον από το pH, τη σκληρότητα, τα ολικά στερεά, το συνολικό οργανικό άνθρακα καθώς επίσης, κατά προτίμηση, και από το αμμώνιο, τα νιτρώδη και την αλκαλικότητα και, για τα θαλάσσια είδη, την αλατότητά του. Οι παράμετροι που παίζουν σημαντικό ρόλο στην άριστη διαβίωση των ψαριών είναι απόλυτα γνωστοί, στο παράρτημα 1 όμως δίνονται ορισμένες συνιστώμενες μέγιστες συγκεντρώσεις για ορισμένες παραμέτρους γλυκού και θαλασσινού νερού για τις δοκιμές.

Κατά τη διάρκεια μίας δοκιμής το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Η τιμή του pH θα πρέπει να είναι στην περιοχή από 6,0 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μίας δεδομένης δοκιμής δεν πρέπει να κυμαίνεται πέραν των $\pm 0,5$ μονάδων pH. Για να διασφαλίζεται ότι το νερό της αραιώσης δεν θα επηρεάσει απότομα το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ., δημιουργώντας σύμπλοκα με την υπό δοκιμή ουσία) ή δεν θα επηρεάσει δυσμενώς τη συμπεριφορά των ψαριών, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν ένα νερό είναι γνωστό ότι είναι σχετικά σταθερό από πλευράς ποιότητας θα πρέπει, π.χ., κάθε τρεις μήνες, να γίνεται προσδιορισμός βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), γεωργικών φαρμάκων (π.χ. συνολικά οργανοφωσφορικά και συνολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα), συνολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών. Εάν η ποιότητα του νερού έχει καταδειχθεί ότι είναι σταθερή για ένα τουλάχιστον χρόνο, οι προσδιορισμοί μπορούν να είναι λιγότερο συχνόι και κατά μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (π.χ. κάθε έξι μήνες).

Η φυσική περιεκτικότητα του νερού σε σωματίδια καθώς επίσης και σε συνολικό οργανικό άνθρακα (TOC) θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερη για να αποφεύγεται τυχόν προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην οργανική ύλη, πράγμα το οποίο μπορεί να μειώσει τη βιοδιαθεσιμότητά της (4). Η μέγιστη αποδεκτή τιμή είναι 5 mg/l όσον αφορά τη διαμερισμένη ύλη (ξηρά ουσία, μη διερχόμενη από φίλτρο 0,45 μm) και 2 mg/l όσον αφορά το συνολικό οργανικό άνθρακα (βλ. παράρτημα 1). Αν είναι αναγκαίο, το νερό πρέπει να διηθείται πριν χρησιμοποιηθεί. Η συνεισφορά στη συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα στο νερό από τα ψάρια (απεκρίσεις) και από τα υπολείμματα τροφών θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη. Καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα στο δοχείο δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κατά ποσότητα μεγαλύτερη των 10 mg/l ($\pm 20\%$) τη συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα που προέρχεται από την υπό δοκιμή ουσία και, εφόσον χρησιμοποιείται, από τον παράγοντα διαλυτοποίησης.

1.7.3

Διαλύματα δοκιμής

Παρασκευάζεται ένα αρχικό διάλυμα της προς δοκιμή ουσίας με κατάλληλη συγκέντρωση. Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζεται με απλή ανάμιξη ή ανάδευση της προς δοκιμή ουσίας στο νερό αραιώσης. Η χρήση διαλυτών ή μέσω διασποράς (διαλυτοποιητικών παραγόντων) καλόν είναι να αποφεύγεται. Εντούτοις, μπορεί αυτό να χρειάζεται μερικές φορές για την παρασκευή αρχικού διαλύματος κατάλληλης συγκέντρωσης. Οι διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη, ο μονομεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, ο διμεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη. Μέσα διασποράς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το Cremophor RH40, το Tween 80, μεθυλοκνταρίνη 0,01% και το HCO-40. Όταν χρησιμοποιούνται ευκόλως βιοασπικοδομήσιμοι παράγοντες, η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται με προσοχή γιατί μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα με ανάπτυξη βακτηρίων στις δοκιμές διαρκούς ροής νερού. Η προς δοκιμή ουσία μπορεί να είναι ραδιοχρηθετημένη ενώ θα πρέπει να είναι του υψηλότερου δυνατού βαθμού καθαρότητας (π.χ. κατά προτίμηση >98%).

Στις δοκιμές διαρκούς ροής νερού, για την προσαγωγή των διαλυμάτων στους θαλάμους δοκιμής απαιτείται ένα σύστημα το οποίο να παρέχει συνεχώς και να αραιώνει ένα αρχικό διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας (π.χ. αντλία μετρήσεως, αναλογικός αραιωτής, σύστημα κορεσμού). Κατά προτίμηση, ο όγκος του νερού κάθε θαλάμου δοκιμής αντικαθίσταται πέντε τουλάχιστον φορές την ημέρα. Η διαδικασία διαρκούς ροής νερού προτιμάται, όταν όμως αυτό δεν είναι δυνατόν (π.χ. όταν οι προς δοκιμή οργανισμοί επηρεάζονται δυσμενώς) μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μία ημιστατική τεχνική υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας. Ο ρυθμός ροής των αρχικών διαλυμάτων και του νερού αραιώσης θα πρέπει να ελέγχεται 48 ώρες πριν και κατόπιν τουλάχιστον κάθε ημέρα κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Στον έλεγχο αυτό περιλαμβάνεται και ο προσδιορισμός του ρυθμού ροής διαμέσου κάθε θαλάμου δοκιμής, θα πρέπει δε να διασφαλίζεται να μη ποικίλλει σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% είτε εντός είτε μεταξύ των θαλάμων.

1.7.4

Επιλογή του είδους

Σημαντικά κριτήρια για την επιλογή του είδους είναι το να βρίσκονται εύκολα, το να μπορούν να λαμβάνονται στα κατάλληλα μεγέθη και το να μπορούν να διατηρούνται ικανοποιητικά στο εργαστήριο. Άλλα κριτήρια για την επιλογή του είδους των ψαριών είναι η σπουδαιότητά τους από αναπαραγωγικής, εμπορικής και οικολογικής πλευράς καθώς επίσης και η συγκρίσιμη ευαισθησία, η παρελθούσα επιτυχής χρήση, κλπ.

Διάφορα συνιστώμενα είδη περιλαμβάνονται στο παράρτημα 2. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, η διαδικασία όμως της δοκιμής μπορεί να πρέπει να προσαρμοστεί ώστε να επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να αναφέρεται η αιτιολογία της επιλογής του είδους και της πειραματικής μεθόδου.

1.7.5 Διατήρηση των ψαριών

Ο αρχικός πληθυσμός των ψαριών εγκλιματίζεται για δύο τουλάχιστον εβδομάδες σε νερό στη θερμοκρασία δοκιμής και κατά το διάστημα αυτό διατρέφεται επαρκώς και με τον ίδιο τύπο διαίτας με εκείνον που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Έπειτα από ένα πρώτο χρονικό διάστημα 48 ωρών, καταγράφονται οι θνησιμότητες και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

- Θνησιμότητα μεγαλύτερη του 10% του πληθυσμού σε επτά ημέρες. Στην περίπτωση αυτή απορρίπτεται όλη η παρτίδα.
- Θνησιμότητα μεταξύ 5 και 10% του πληθυσμού σε επτά ημέρες. Συνεχίζεται ο εγκλιματισμός για επτά ακόμη ημέρες.
- Θνησιμότητα μικρότερη του 5% του πληθυσμού σε επτά ημέρες. Η παρτίδα θεωρείται αποδεκτή. Εάν κατά τη διάρκεια των επόμενων επτά ημερών εμφανιστεί θνησιμότητα μεγαλύτερη του 5%, η όλη παρτίδα απορρίπτεται.

Πρέπει να διασφαλίζεται ότι τα ψάρια που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές είναι απηλλαγμένα από τυχόν εμφανείς ασθένειες ή ανωμαλίες. Αν υπάρχουν άρρωστα ψάρια, αυτά πρέπει να απορρίπτονται. Κατά τη διάρκεια των δύο εβδομάδων που προηγούνται της δοκιμής ή κατά τη διάρκεια της δοκιμής, δεν θα πρέπει να γίνεται καμμία θεραπευτική αγωγή των ψαριών για τυχόν ασθένεια.

1.8 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.8.1 Προκαταρκτική δοκιμή

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της οριστικής δοκιμής, μπορεί να είναι χρήσιμο να γίνει ένα προκαταρκτικό πείραμα π.χ. επιλογή της ή των συγκεντρώσεων της προς δοκιμή ουσίας, διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής.

1.8.2 Συνθήκες έκθεσης

1.8.2.1 Διάρκεια της φάσης πρόσληψης

Μία πρόβλεψη της διάρκειας της φάσης πρόσληψης μπορεί να γίνει με βάση εμπειρίες που έχουν αποκτηθεί στην πράξη (π.χ. από μία προηγούμενη μελέτη ή κάποια χημική ουσία που σχετίζεται με τη συσσωρευόμενη) ή από ορισμένες εμπειρικές σχέσεις στις οποίες χρησιμοποιείται ή η γνωστή υδατοδιαλυτότητα ή ο γνωστός συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού της υπό δοκιμή ουσίας (βλ. παράρτημα 3).

Η φάση πρόσληψης θα πρέπει να διαρκεί 28 ημέρες εκτός κι αν αποδεδειγμένα επιτευχθεί νωρίτερα η ισορροπία. Εάν μέχρι την 28η ημέρα δεν έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, η φάση πρόσληψης θα πρέπει να παρατείνεται, λαμβάνοντας κι άλλες μετρήσεις, μέχρις ότου επιτευχθεί σταθερή κατάσταση ή για 60 ημέρες, όποιο συμβεί νωρίτερα από τα δύο.

1.8.2.2 Διάρκεια της φάσης αποβολής

Για να επιτευχθεί η ενδεδειγμένη (π.χ. 95%) μείωση του φορτίου της ουσίας στο σώμα (βλ. παράρτημα 3 για εξήγηση της εκτίμησης) αρκεί συνήθως ένα χρονικό διάστημα ίσο με το μισό της διάρκειας της φάσης πρόσληψης. Εάν ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη αυτής της τιμής του 95% είναι υπερβολικά μεγάλος, ξεπερνώντας π.χ. το διπλάσιο της κανονικής διάρκειας της φάσης πρόσληψης (δηλ. περισσότερο από 56 ημέρες), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα μικρότερο χρονικό διάστημα (δηλ. μέχρις ότου η τιμή της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας είναι μικρότερη του 10% της τιμής στη σταθερή κατάσταση). Εντούτοις, για ουσίες που έχουν πολυπλοκότερα διαγράμματα πρόσληψης και αποβολής από εκείνα που αντιπροσωπεύονται από το μοντέλο του ενός διαμερίσματος, με κινητική πρώτης τάξεως, επιτρέπονται και μεγαλύτερες διάρκειες φάσεις αποβολής για τον προσδιορισμό των σταθερών ρυθμού απώλειας. Η περίοδος μπορεί, εντούτοις, να εξαρτάται από την περίοδο κατά την οποία η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια παραμένει πάνω από το αναλυτικό όριο ανίχνευσης.

1.8.2.3 Αριθμός των υπό δοκιμή ψαριών

Ο αριθμός των ανά συγκέντρωση δοκιμής ψαριών επιλέγεται έτσι ώστε σε κάθε δειγματοληψία να υπάρχουν διαθέσιμα τουλάχιστον τέσσερα ψάρια ανά δείγμα. Εάν χρειάζεται μεγαλύτερη στατιστική αξιοπιστία, απαιτούνται περισσότερα ψάρια ανά δείγμα.

Εάν χρησιμοποιούνται ενήλικα ψάρια, πρέπει να αναφέρεται αν είναι αρσενικά ή θηλυκά ή αν στο πείραμα χρησιμοποιούνται και από τα δύο. Εάν χρησιμοποιούνται και από τα δύο φύλα τότε, πριν από την έναρξη της έκθεσης, θα πρέπει να επιβεβαιώνεται ότι οι διαφορές στο λιπιδικό περιεχόμενο των δύο φύλων δεν είναι σημαντικές, αφού διαφορετικά μπορεί να χρειάζεται να συγκεντρωθούν ξεχωριστά όλα τα αρσενικά και όλα τα θηλυκά.

Για κάθε δοκιμή επιλέγονται ψάρια παρόμοιου βάρους έτσι ώστε τα μικρότερα να μην είναι ελαφρύτερα από τα δύο τρίτα του βάρους των μεγαλύτερων. Όλα τα ψάρια θα πρέπει να είναι της ίδιας τάξης ηλικίας και να προέρχονται από την ίδια πηγή. Επειδή το βάρος και η ηλικία των ψαριών φαίνεται να έχουν μερικές φορές σημαντική επίδραση στις τιμές του ΣΒΣ (1), τα στοιχεία αυτά καταγράφονται με ακρίβεια. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα από το αρχικό απόθεμα των ψαριών για να γίνεται μία εκτίμηση του μέσου βάρους.

1.8.2.4 Πλήρωση

Για να ελαχιστοποιείται η μείωση της C_w που προκαλείται από την προσθήκη των ψαριών κατά την έναρξη της δοκιμής και να αποφεύγονται επίσης πτώσεις στη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου, οι χρησιμοποιούμενες τιμές του λόγου νερού προς ψάρια είναι υψηλές. Σημαντικό ρόλο παίζει ο ρυθμός πλήρωσης να είναι κατάλληλος για το χρησιμοποιούμενο είδος ψαριού. Εν πάσει περιπτώσει, ο συνιστώμενος συνήθως ρυθμός πλήρωσης είναι 0,1-1,0 g ψαριών (υγρό βάρος) ανά λίτρο νερού ανά ημέρα. Υψηλοί ρυθμοί πλήρωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν εάν διαφαίνεται ότι η απαιτούμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να διατηρηθεί στα όρια του $\pm 20\%$ και ότι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου δεν πέφτει κάτω από το 60% του σημείου κορεσμού.

Για να επιλεγούν οι κατάλληλες διαδικασίες πλήρωσης, λαμβάνεται υπόψη το κατάλληλο περιβάλλον διαβίωσης του είδους. Για παράδειγμα, τα ψάρια που ζουν στο βυθό μπορεί να χρειάζονται μεγαλύτερο εμβαδόν πυθμένα του ενυδρείου για τον ίδιο όγκο νερού σε σχέση με τα ψάρια του πελάγους.

1.8.2.5 Διατροφή

Κατά τη διάρκεια των περιόδων εγκλιματισμού και δοκιμής, τα ψάρια διατρέφονται με κατάλληλη διαίτα γνωστού λιπιδικού και συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου, σε ποσότητα ικανή ώστε να παραμένουν σε υγιή κατάσταση και να διατηρούν το σωματικό τους βάρος. Τα ψάρια διατρέφονται καθημερινά καθ' όλη τη διάρκεια των περιόδων εγκλιματισμού και δοκιμής σε επίπεδα περίπου 1 έως 2% του σωματικού τους βάρους ανά ημέρα. Με τον τρόπο αυτό η λιπιδική συγκέντρωση στα περισσότερα είδη ψαριών διατηρείται σε ένα σχετικώς σταθερό επίπεδο κατά την διάρκεια της δοκιμής. Η ποσότητα της τροφής θα πρέπει να ξαναυπολογίζεται, π.χ., μία φορά την εβδομάδα, για να διατηρείται με συνέπεια το σωματικό βάρος και το λιπιδικό περιεχόμενο. Για τον υπολογισμό αυτό, το βάρος των ψαριών σε κάθε θάλαμο δοκιμής μπορεί να εκτιμάται από το βάρος των προσφάτως δειγματοληφθέντων από το θάλαμο αυτό ψαριών. Τα ψάρια που παραμένουν στο θάλαμο δεν ζυγίζονται.

Τα αποφάγια και οι απεκκρίσεις απομακρύνονται καθημερινά από τους θαλάμους δοκιμής με σιφονισμό λίγο μετά τη διατροφή (30 λεπτά έως 1 ώρα). Οι θάλαμοι διατηρούνται όσο το δυνατόν καθαρότεροι καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής έτσι ώστε η συγκέντρωση της οργανικής ύλης να διατηρείται όσο το δυνατόν χαμηλότερη, δεδομένου ότι η παρουσία οργανικού άνθρακα μπορεί να περιορίσει τη βιοδιαθεσιμότητα της υπό δοκιμή ουσίας (1).

Επειδή πολλές τροφές προέρχονται από ιχθυάλευρα, οι τροφές θα πρέπει να αναλύονται μήπως τυχόν υπάρχει σε αυτές η υπό δοκιμή ουσία. Επίσης, καλόν είναι να γίνεται ανάλυση για τυχόν ύπαρξη γεωργικών φαρμάκων και βαρέων μετάλλων.

1.8.2.6 Φως και θερμοκρασία

Η φωτοπερίοδος είναι συνήθως 12 έως 16 ώρες ενώ η θερμοκρασία ($\pm 2^\circ\text{C}$) θα πρέπει να είναι κατάλληλη για το είδος των ψαριών της δοκιμής (βλ. παράρτημα 2). Ο τύπος και τα χαρακτηριστικά του φωτισμού θα πρέπει να είναι γνωστά. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται μήπως τυχόν η υπό δοκιμή ουσία φωτομετασχηματίζεται υπό τις συνθήκες φωτισμού της δοκιμής. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλος φωτισμός για να αποφεύγεται η έκθεση των ψαριών σε μη φυσικά φωτοπροϊόντα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί κάποιο φίλτρο για την απομάκρυνση UV ακτινοβολίας κάτω των 290 nm.

1.8.2.7 Συγκεντρώσεις της δοκιμής

Τα ψάρια εκτίθενται υπό συνθήκες διαρκούς ροής σε δύο τουλάχιστον συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό. Κανονικά, η ανώτερη (ή ανώτατη) συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας επιλέγονται να είναι περίπου το 1% της οξείας ασυμπτωτικής τιμής της LC_{50} και τουλάχιστον δέκα φορές υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης της στο νερό με την χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο.

Η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής μπορεί επίσης να προσδιοριστεί διαιρώντας την οξεία 96h LC₅₀ με μία κατάλληλη σχέση οξείας/χρονίας (οι κατάλληλοι λόγοι για ορισμένες χημικές ουσίες μπορεί να είναι περίπου 3 μέχρι 100). Εάν είναι δυνατόν, η ή οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις επιλέγονται έτσι ώστε να διαφέρουν από την παραπάνω κατά ένα συντελεστή δέκα. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν λόγω του κριτηρίου του 1% της LC₅₀ και του αναλυτικού ορίου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατώτερος του 10 συντελεστής ή θα πρέπει να εξεταστεί η χρήση επισημασμένης με ¹⁴C ουσίας δοκιμής. Καμμία από τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις δεν θα πρέπει να είναι υψηλότερη από τη διαλυτότητα της υπό δοκιμή ουσίας.

Όταν χρησιμοποιείται κάποιος διαλυτοποιητικός παράγοντας, η συγκέντρωσή του δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/l ενώ θα πρέπει να είναι η ίδια σε όλα τα δοχεία δοκιμής. Η συνεισφορά του, μαζί με την υπό δοκιμή ουσία, στη συνολική περιεκτικότητα του νερού δοκιμής σε οργανικό άνθρακα θα πρέπει να είναι γνωστή. Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή χρήσης τέτοιων υλικών.

1.8.2.8 *Μάρτυρες*

Στη σειρά δοκιμών θα πρέπει να περιλαμβάνεται και ένας μάρτυρας νερού αραιώσης ή, εφόσον χρησιμοποιείται τέτοιος παράγοντας, ένας μάρτυρας με διαλυτοποιητικό παράγοντα, υπό την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι ο παράγοντας δεν έχει καμμία επίδραση στα ψάρια. Εάν όχι, θα πρέπει να παρασκευάζονται και οι δύο μάρτυρες.

1.8.3 **Συχνότητα λήψης μετρήσεων της ποιότητας του νερού**

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, σε όλα τα δοχεία θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου, του TOC, του pH και της θερμοκρασίας. Στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με την ανώτερη (ή ανώτατη) συγκέντρωση θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις της ολικής σκληρότητας και αλατότητας, εάν χρειάζεται. Το διαλυμένο οξυγόνο και η αλατότητα, εφόσον χρειάζεται, θα πρέπει να μετριούνται τουλάχιστον τρεις φορές - στην αρχή, γύρω στο μέσον και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης - και μία φορά την εβδομάδα κατά την περίοδο αποβολής. Ο TOC θα πρέπει να μετριέται στην αρχή της δοκιμής (24h και 48h πριν από την έναρξη της φάσης πρόσληψης) πριν από την προσθήκη των ψαριών και τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια τόσο της φάσης πρόσληψης όσο και της φάσης αποβολής. Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετριέται κάθε μέρα, το pH στην αρχή και στο τέλος κάθε περιόδου και η σκληρότητα μία φορά σε κάθε δοκιμή. Η θερμοκρασία θα πρέπει κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα τουλάχιστον δοχείο.

1.8.4 **Δειγματοληψία και ανάλυση ψαριών και νερού**

1.8.4.1 *Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας ψαριών και νερού*

Δείγματα νερού για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας λαμβάνονται πριν από την προσθήκη των ψαριών και κατά τη διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Τα δείγματα του νερού λαμβάνονται τουλάχιστον ταυτόχρονα με τα ψάρια και πριν από τη διατροφή. Κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας για να ελέγχεται αν είναι σύμφωνες με τα κριτήρια εγκυρότητας.

Δείγματα ψαριών λαμβάνονται τουλάχιστον πέντε φορές κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης και τουλάχιστον τέσσερις φορές κατά τη διάρκεια της φάσης αποβολής. Επειδή ορισμένες φορές είναι δύσκολο να γίνει μία λογικά ακριβής εκτίμηση της τιμής του ΣΒΣ με βάση τον αριθμό αυτό δειγμάτων, ιδιαίτερα όταν η κινητική της αποβολής δεν είναι μία απλή κινητική πρώτης τάξεως, μπορεί να λαμβάνονται δείγματα με υψηλότερες συχνότητες και τις δύο περιόδους (βλ. παράρτημα 4). Τα επιπλέον δείγματα αποθηκεύονται και αναλύονται μόνον αν τα αποτελέσματα του πρώτου γύρου αναλύσεων αποδειχθούν απρόσφορα για τον υπολογισμό του ΣΒΣ με την επιθυμητή ακρίβεια.

Ένα παράδειγμα αποδεκτού χρονοδιαγράμματος δειγματοληψίας δίδεται στο παράρτημα 4. Μπορούν το ίδιο εύκολα να καταρτιστούν και άλλα χρονοδιαγράμματα χρησιμοποιώντας άλλες καθ' υπόθεση τιμές P_{ow} για τον υπολογισμό του χρόνου έκθεσης για πρόσληψη ύψους 95%.

Η δειγματοληψία συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης μέχρις ότου αποκατασταθεί σταθερή κατάσταση ή για 28 ημέρες, ανάλογα με το ποιο από τα δύο είναι ενωρίτερα. Εάν μέσα σε 28 ημέρες δεν αποκατασταθεί σταθερή κατάσταση, η δειγματοληψία συνεχίζεται μέχρις ότου αποκατασταθεί σταθερή κατάσταση ή για 60 ημέρες, ανάλογα με το ποιά περίπτωση φθάνει ενωρίτερα. Πριν αρχίσει η φάση αποβολής τα ψάρια μεταφέρονται σε καθαρές δεξαμενές.

1.8.4.2 *Δειγματοληψία και παρασκευή δείγματος*

Δείγματα νερού για ανάλυση λαμβάνονται π.χ. δια σιφωνισμού μέσω αδρανών σοληνώσεων από ένα κεντρικό σημείο του θαλάμου δοκιμής. Επειδή ούτε η διήθηση ούτε η φυγοκέντρωση φαίνεται να διαχωρίζουν πάντοτε το μη βιοδιαθέσιμο κλάσμα της υπό δοκιμή ουσίας από εκείνο που είναι βιοδιαθέσιμο (ειδικά στην περίπτωση υπερλιπόφιλων χημικών ουσιών δηλ. των ουσιών εκείνων με log P_{ow} >5) (1)(5), τα δείγματα μπορούν να μην υποβάλλονται σε αυτές τις κατεργασίες.

Αντ' αυτού, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε οι δεξαμενές να διατηρούνται όσο το δυνατόν καθαρότερες ενώ κατά τη διάρκεια τόσο της φάσης πρόσληψης όσο και της φάσης αποβολής θα πρέπει να παρακολουθείται η περιεκτικότητα σε συνολικό οργανικό άνθρακα.

Σε κάθε δειγματοληψία, από τους θαλάμους δοκιμής λαμβάνεται κατάλληλος αριθμός ψαριών (κανονικά τουλάχιστον τέσσερα). Τα δειγματοληπτούμενα ψάρια πλένονται γρήγορα με νερό, στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί, θανατώνονται ακαριαία με τον προσφορότερο και ανθρωπιστικότερο τρόπο και κατόπιν ζυγίζονται.

Προτιμότερο είναι η ανάλυση των ψαριών και του νερού να γίνεται αμέσως μετά τη δειγματοληψία για να εμποδίζεται τυχόν αποικοδόμηση ή άλλες απώλειες και να υπολογίζονται κατά προσέγγιση ρυθμοί πρόσληψης και αποβολής καθώς προχωρεί η δοκιμή. Με την άμεση ανάλυση αποφεύγονται επίσης καθυστερήσεις στον προσδιορισμό όταν έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση.

Αν δεν μπορεί να γίνει αμέσως η ανάλυση, τα δείγματα αποθηκεύονται με μία κατάλληλη μέθοδο. Πριν αρχίσει η μελέτη, λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την καταλληλότερη μέθοδο αποθήκευσης για τη συγκεκριμένη ουσία - π.χ., βαθεία κατάψυξη, διατήρηση στους 4°C, διάρκεια της αποθήκευσης, εκχύλιση, κλπ.

1.8.4.3 Ποιότητα της αναλυτικής μεθόδου

Επειδή η όλη διαδικασία εξαρτάται βασικά από την ορθότητα, την ακρίβεια και την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται για την υπό δοκιμή ουσία, ελέγχεται πειραματικά αν η ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης της ουσίας, καθώς επίσης και η ανάκτηση της υπό δοκιμή ουσίας, από το νερό και τα ψάρια είναι ικανοποιητικές για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Ελέγχεται επίσης μήπως τυχόν στο χρησιμοποιούμενο νερό αραιώσεως υπάρχει ανιχνεύσιμη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας.

Εφόσον χρειάζεται, οι ευρισκόμενες από τη δοκιμή τιμές των C_w και C_f διορθώνονται για να ληφθούν υπόψη οι τιμές ανάκτησης και οι τιμές προϋπαρχουσών συγκεντρώσεων στους μάρτυρες. Ο χειρισμός των δειγμάτων του νερού και των ψαριών γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι κίνδυνοι μόλυνσης και απωλειών (που προέρχονται π.χ. από προσρόφηση από τον εξοπλισμό δειγματοληψίας).

1.8.4.4 Ανάλυση του δείγματος ψαριών

Εάν στη δοκιμή χρησιμοποιούνται ραδιοϊχνηθετημένα υλικά, μπορεί ή να προσδιοριστεί το σύνολο του ραδιοϊχνηθέτη (δηλ. μητρική ουσία και μεταβολίτες) ή τα δείγματα να καθαριστούν έτσι ώστε να μπορεί να αναλυθεί μόνον η μητρική ουσία. Επίσης, οι βασικοί μεταβολίτες μπορούν να χαρακτηριστούν ή σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης, όποιο έλθει ενωρίτερα. Εάν ο ΣΒΣ ως προς τα συνολικά ραδιοϊχνηθετημένα υπολείμματα είναι $\geq 1000\%$, μπορεί να είναι προτιμότερο, σε ορισμένες δε κατηγορίες χημικών ουσιών όπως τα γεωργικά φάρμακα συνιστάται ιδιαίτερα, να ταυτοποιούνται και να προσδιορίζονται ποσοτικά τα προϊόντα αποικοδόμησης που αντιπροσωπεύουν ποσοστό $\geq 10\%$ των συνολικών υπολειμμάτων στους ιστούς των ψαριών σε σταθερή κατάσταση. Εάν ταυτοποιηθούν και προσδιοριστούν ποσοτικά προϊόντα αποικοδόμησης που αντιπροσωπεύουν ποσοστό $\geq 10\%$ των συνολικών ραδιοϊχνηθετημένων υπολειμμάτων στους ιστούς των ψαριών, συνιστάται επίσης να ταυτοποιούνται και να προσδιορίζονται ποσοτικά και τα προϊόντα αποικοδόμησης στο νερό δοκιμής.

Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας πρέπει συνήθως να προσδιορίζεται σε κάθε ζυγισμένο επιμέρους ψάρι. Εάν κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατόν, μπορεί να γίνεται συγκέντρωση των δειγμάτων σε κάθε δειγματοληψία αλλά η συγκέντρωση περιορίζει τις στατιστικές διαδικασίες που μπορούν να εφαρμοστούν στα δεδομένα. Εάν παίζει σημαντικό ρόλο το να εφαρμοστεί κάποια συγκεκριμένη στατιστική διαδικασία και αξιοπιστία, τότε στη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο κατάλληλος αριθμός ψαριών που συμβαδίζει με την επιθυμητή διαδικασία συγκέντρωσης και αξιοπιστία (6)(7).

Ο ΣΒΣ θα πρέπει να εκφράζεται ως συνάρτηση του συνολικού υγρού βάρους και, στην περίπτωση λίαν λιπόφιλων ουσιών, ως συνάρτηση του λιπιδικού περιεχομένου. Εφόσον είναι δυνατόν, το λιπιδικό περιεχόμενο των ψαριών προσδιορίζεται σε κάθε δειγματοληψία. Για τον προσδιορισμό του λιπιδικού περιεχομένου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι (σημ. 8 και 2 του παραρτήματος 3). Ως πρότυπη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της εκχύλισης με χλωροφόρμιο/μεθανόλη (9). Οι διάφορες υπάρχουσες μέθοδοι δεν δίνουν ταυτόσημα αποτελέσματα (10), επομένως παίζει σημαντικό ρόλο το να δίδονται στοιχεία για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Εφόσον είναι δυνατόν, η ανάλυση για τα λιπίδια θα πρέπει να γίνεται στο ίδιο εκχύλισμα με εκείνο που προορίζεται για ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας, επειδή τα λιπίδια πρέπει συχνά να απομακρύνονται από το εκχύλισμα πριν αυτό υποβληθεί σε χρωματογραφική ανάλυση. Το λιπιδικό περιεχόμενο των ψαριών (ως mg/kg υγρού βάρους) στο τέλος του πειράματος δεν θα πρέπει να διαφέρει από εκείνο της αρχής περισσότερο από $\pm 25\%$. Θα πρέπει επίσης να αναφέρεται και η % περιεκτικότητα των ιστών σε στερεά ώστε να μπορεί να γίνεται μετατροπή της λιπιδικής συγκέντρωσης από ξηρά σε υγρή βάση.

2. ΔΕΛΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η καμπύλη πρόσληψης της υπό δοκιμή ουσίας λαμβάνεται με γραφική παράσταση της συγκέντρωσής της στα/επί των ψαριών (ή των συγκεκριμένων ιστών) στη φάση πρόσληψης συναρτήσει του χρόνου σε αριθμητικές κλίμακες. Εάν η καμπύλη έχει φθάσει σε "πλατώ", αν δηλ. παρουσιάζει ασυμπτωτική σχεδόν πορεία σε σχέση με τον άξονα του χρόνου, ο $\Sigma\text{B}\Sigma_{\text{σκ}}$ υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\frac{C_f \text{ σε σταθερή κατάσταση (μέση)}}{C_w \text{ σε σταθερή κατάσταση (μέση)}}$$

Εάν δεν επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, ενδέχεται να μπορεί να υπολογιστεί ένας $\Sigma\text{B}\Sigma_{\text{σκ}}$ επαρκούς ακρίβειας από πλευράς εκτίμησης κινδύνων από μία "σταθερή κατάσταση" στο 80% ($1,6/k_2$) ή 95% ($3,0/k_2$) της ισορροπίας.

Προσδιορίζεται επίσης και ο συντελεστής συγκέντρωσης ($\Sigma\text{B}\Sigma_{\text{κ}}$), ως ο λόγος k_1/k_2 , των δύο σταθερών κινητικής πρώτης τάξεως. Η σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) προσδιορίζεται συνήθως από την καμπύλη αποβολής (δηλ. τη γραφική παράσταση της μείωσης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια συναρτήσει του χρόνου). Κατόπιν υπολογίζεται η σταθερά ρυθμού πρόσληψης (k_1) με βάση την k_2 και μία τιμή C_f που προέρχεται από την καμπύλη πρόσληψης (βλ. επίσης παράρτημα 5). Η μέθοδος που προτιμάται για τη λήψη του $\Sigma\text{B}\Sigma_{\text{κ}}$ και των σταθερών k_1 και k_2 , είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (11). Διαφορετικά, για τον υπολογισμό των k_1 και k_2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν γραφικές μέθοδοι. Εάν η καμπύλη αποβολής είναι φανερό ότι δεν ανήκει στις καμπύλες πρώτης τάξεως, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πολυπλοκότερα μοντέλα (βλ. βιβλιογραφία παραρτήματος 3) και να ζητούνται οδηγίες από έναν βιοστατιστικολόγο.

2.2 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου.

Εάν οι καμπύλες πρόσληψης και αποβολής είναι σαφώς οριοθετημένες, αυτό αποτελεί ένδειξη δεδομένων βιοσυγκέντρωσης καλής ποιότητας. Η διαφορά στις σταθερές πρόσληψης/αποβολής μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων της δοκιμής θα πρέπει να είναι λιγότερο του 20%. Εάν παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές στους ρυθμούς πρόσληψης/αποβολής μεταξύ των δύο χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων δοκιμής, αυτές θα πρέπει να καταγράφονται και να δίδονται πιθανές εξηγήσεις. Γενικά, το όριο εμπιστοσύνης των $\Sigma\text{B}\Sigma$ που λαμβάνονται από καλοσχεδιασμένες μελέτες πλησιάζει το $\pm 20\%$.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

3.1 ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ:

- Φυσική μορφή και, όπου απαιτείται, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά;
- Δεδομένα χημικής ταυτοποίησης (στα οποία συμπεριλαμβάνεται και η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, αν χρειάζεται);
- Εφόσον έχει πραγματοποιηθεί ραδιοϊχνηθέτηση, η ακριβής θέση του ή των επισημασμένων ατόμων και το ποσοστό ραδιενέργειας που οφείλεται σε προσμείξεις;

3.2 ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΕΙΔΟΣ:

- Επιστημονική ονομασία, στέλεχος, πηγή, τυχόν προηγηθείσα αγωγή, εγκλιματισμός, ηλικία, κλίμακα μεγεθών, κλπ.

3.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ:

- Χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (ροής νερού ή ημιστατική);
- Τύπος και χαρακτηριστικά του χρησιμοποιηθέντος φωτισμού και φωτοπερίοδος(οι);

- Σχέδιο δοκιμής (π.χ. αριθμός και μέγεθος θαλάμων δοκιμής, ρυθμός αντικατάστασης νερού, αριθμός ταυτόσημων επαναλήψεων, αριθμός ψαριών ανά ταυτόσημη επανάληψη, αριθμός συγκεντρώσεων δοκιμής, διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής, συχνότητα δειγματοληψίας για τη λήψη δειγμάτων ψαριών και νερού);
- Μέθοδος παρασκευής αρχικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (εφόσον χρησιμοποιείται, πρέπει να αναφέρεται ο διαλυτοποιητικός παράγοντας, η συγκέντρωσή του και η συνεισφορά του στη συγκέντρωση οργανικού άνθρακα στο νερό δοκιμής);
- Οι ονομαστικές συγκεντρώσεις των δοκιμών, οι μέσες τιμές των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοχεία δοκιμής και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν;
- Πηγή του νερού αραιώσης, περιγραφή τυχόν προηγηθείσας επεξεργασίας, αποτελέσματα οποιασδήποτε αποδεικτικής διαδικασίας για την ικανότητα των υπό δοκιμή ψαριών να ζουν στο νερό και χαρακτηριστικά του νερού ήτοι pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετράται), συνολικός οργανικός άνθρακας, αιωρούμενα στερεά, αλατότητα του μέσου δοκιμής (εφόσον χρειάζεται) και οποιοσδήποτε άλλες πραγματοποιηθείσες μετρήσεις;
- Ποιότητα του νερού στα δοχεία δοκιμής, pH, σκληρότητα, TOC, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου;
- Λεπτομερείς πληροφορίες για τη διατροφή (π.χ. τύπος τροφής, πηγή, σύσταση - τουλάχιστον λιπιδικό και πρωτεϊνικό περιεχόμενο εάν είναι δυνατόν, δοθείσες ποσότητες και συχνότητα);
- στοιχεία για την κατεργασία των δειγμάτων ψαριών και νερού, συμπεριλαμβανομένων και στοιχείων παρασκευής, αποθήκευσης, διαδικασιών εκχύλισης και αναλύσεως (και ακρίβεια) για την υπό δοκιμή ουσία και το λιπιδικό περιεχόμενο (εφόσον μετρείται).

3.4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

- Αποτελέσματα από τυχόν πραγματοποιηθείσα προκαταρκτική μελέτη;
- Θνησιμότητα των μαρτύρων και των υπό δοκιμή ψαριών σε κάθε θάλαμο έκθεσης και τυχόν παρατηρηθείσα ανώμαλη συμπεριφορά;
- Το λιπιδικό περιεχόμενο των ψαριών (εάν έγινε προσδιορισμός κατά τη δοκιμή);
- Καμπύλες (συμπεριλαμβανομένων και όλων των μετρηθέντων δεδομένων) από τις οποίες φαίνεται η πρόσληψη και αποβολή της χημικής ουσίας στα ψάρια κατά το χρονικό διάστημα μέχρι τη σταθερή κατάσταση;
- Οι C_f και C_w (με τυπική απόκλιση και εόρος, αν απαιτείται) για όλες τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (με την C_f εκφραζόμενη σε $\mu\text{g/g}$ υγρού βάρους (ppm) του συνόλου του σώματος ή συγκεκριμένων ιστών του π.χ. λιπίδια, και την C_w σε $\mu\text{g/ml}$ (ppm)), καθώς και οι τιμές C_w για τη σειρά των μαρτύρων (θα πρέπει να αναφέρεται και η προϋπάρχουσα);
- Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σταθερής κατάστασης ($\Sigma B_{\sigma\kappa}$) και/ή ο συντελεστής κινητικής συγκέντρωσης (ΣB_{κ}) και, εφόσον γίνεται, 95% όρια εμπιστοσύνης για τις σταθερές ρυθμού πρόσληψης και αποβολής (εκφραζόμενες όλες σε σχέση με το σύνολο του σώματος και το συνολικό λιπιδικό περιεχόμενο, εφόσον μετρείται, των ζώων ή συγκεκριμένων ιστών τους), όρια εμπιστοσύνης και τυπική απόκλιση (εφόσον υπάρχουν) και μέθοδοι υπολογισμού/ανάλυσης δεδομένων για κάθε χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας;
- Όπου χρησιμοποιούνται ραδιοϊχνηθημένες ουσίες και, εφόσον απαιτείται, η συσσώρευση τυχόν ανιχνευόμενων μεταβολιτών;
- Οτιδήποτε ασύνηθες γύρω από τη δοκιμή, οποιαδήποτε απόκλιση από τις διαδικασίες αυτές και οποιοσδήποτε άλλες σχετικές πληροφορίες;

Η λήψη αποτελεσμάτων με τον χαρακτηρισμό "μη ανιχνευόμενο στο όριο ανιχνεύσεως" θα πρέπει να αποφεύγεται όσο είναι δυνατόν με την εφαρμογή μεθόδου προδοκιμής και με κατάλληλο πειραματικό σχεδιασμό, επειδή τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό σταθερών ρυθμού.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- 1) **Connel D.W.** (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **102**, σελ. 117-156.
- 2) **Bintein S., Devillers J. and Karcher W.** (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in *Environmental Research*, **1**, 29-390.
- 3) **OECD, Paris** (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. *Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals*. No. 3.
- 4) **Kristensen P.** (1991). Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. *Water Quality Institute, Δαυία*.
- 5) **US EPA 822-R-94-002** (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. Ιούλιος 1994.
- 6) **US FDA, (Food and Drug Administration)** Revision. Pesticide analytical manual, **1**, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, Ιούλιος 1975.
- 7) **US EPA** (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in *Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
- 8) **Compaan H.** (1980) in "The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation" Ch. 2.3, Part II. Κρατικός Οργανισμός Εκδόσεων, Χάγη, Ολλανδία.
- 9) **Gardner et al.,** (1995) *Limn. & Oceanogr.* **30**, 1099-1105.
- 10) **Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J.** (1991). Evaluation of selected methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Env.Tox.Chem.* **10**, σελ. 1431-1436.
- 11) **ΕΕΚ,** Βιοσυγκέντρωση χημικών ουσιών στα ψάρια: Μέθοδος flow-through - Πρόγραμμα διεργαστηριακών δοκιμών, 1984-1985. Τελική έκθεση Μάρτιος 1987. Συγγραφείς: P. Kristensen και N.Nyholm.
- 12) **ASTM E-1022-84** (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΕΩΣ

	ΟΥΣΙΑ	ΟΡΙΑΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
1	Σωματίδια	5 mg/l
2	Ολικός οργανικός άνθρακας	2 mg/l
3	Μη ιονισμένη αμμωνία	1 µg/l
4	Υπολείμματα χλωρίου	10 µg/l
5	Σύνολο οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	50 ng/l
6	Σύνολο οργανοχλωριούχων γεωργικών φαρμάκων μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	50 ng/l
7	Ολικό οργανικό χλώριο	25 ng/l
8	Αργύλλιο	1 µg/l
9	Αρσενικό	1 µg/l
10	Χρόμιο	1 µg/l
11	Κοβάλτιο	1 µg/l
12	Χαλκός	1 µg/l
13	Σίδηρος	1 µg/l
14	Μόλυβδος	1 µg/l
15	Νικέλιο	1 µg/l
16	Ψευδάργυρος	1 µg/l
17	Κάδμιο	100 ng/l
18	Υδράργυρος	100 ng/l
19	Άργυρος	100 ng/l

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ

	Συνιστώμενα είδη	Συνιστώμενη περιοχή θερμοκρασίας δοκιμής (°C)	Συνιστώμενο ολικό μήκος ψαριών δοκιμής (cm)
1	Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Ζέμπρα	20 - 25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Λιποκέφαλος φοξίνος	20 - 25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Κυπρίνος ή γριβάδι	20 - 25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Ρυζόψαρο	20 - 25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Γκάπυ	20 - 25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Γαλαζολιόψαρο	20 - 25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Ιριδίζουσα πέστροφα	13 - 17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Τριάκανθος γαστερόστεος ή αγκαθερό	18 - 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Τομ. 252, σ. 231

Σε πολλές χώρες χρησιμοποιούνται διάφορα θαλασσινά είδη ή είδη διαβιούντα στις εκβολές ποταμών, π.χ.

Κηλιδόψαρο (λειόστομος)	<i>Leiostomus xanthurus</i>
Προβατοκέφαλος	<i>Cyprinodon variegatus</i>
Πλευρασημόψαρο	<i>Menidia beryllina</i>
Πέρκα	<i>Cymatogaster aggregata</i>
Αγγλική γλώσσα	<i>Parophrys vetulus</i>
Ελαφόκερος καλλιόνυμος	<i>Leptocottus armatus</i>
Τριάκανθος γαστερόστεος	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Λαυράκι	<i>Dicentracus labrax</i>
Σίρκο	<i>Alburnus alburnus</i>

ΣΥΛΛΟΓΗ

Τα ψάρια των γλυκών νερών που παρατίθενται στον παραπάνω πίνακα είναι εύκολο να εκτραφούν και/ή βρίσκονται εύκολα καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου, ενώ τα θαλασσινά είδη και τα είδη που διαβιούν στις εκβολές ποταμών περιορίζονται εν μέρει στις αντίστοιχες χώρες. Μπορούν να εκτραφούν και να καλλιεργηθούν είτε σε ιχθυοτροφεία είτε στο εργαστήριο, υπό ελεγχόμενες από πλευράς ασθeneιών και παρασίτων συνθήκες, έτσι ώστε τα προς δοκιμή ζώα να είναι υγιή και γνωστής καταγωγής. Τα ψάρια αυτά μπορούν να βρεθούν σε πολλά μέρη του κόσμου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΩΝ ΦΑΣΕΩΝ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΒΟΛΗΣ

1. Πρόβλεψη της διάρκειας της φάσης πρόσληψης

Πριν από την πραγματοποίηση της δοκιμής, μπορεί να γίνει μία εκτίμηση της k_2 και συνεπώς κάποιου ποσοστού του χρόνου που απαιτείται για την επίτευξη σταθερής κατάστασης από εμπειρικές σχέσεις μεταξύ της k_2 και του συντελεστή κατανομής n-οκτανόλης/νερού (P_{ow}) ή της k_2 και της υδατοδιαλυτότητας (s).

Μία εκτίμηση της k_2 (ημέρα⁻¹) μπορεί να γίνει π.χ. από την ακόλουθη εμπειρική σχέση (1):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 (r^2=0,95) \quad [\text{εξίσωση 1}]$$

Για άλλες σχέσεις βλ. παραπομπή (2)

Εάν ο συντελεστής κατανομής (P_{ow}) δεν είναι γνωστός, μία εκτίμησή του μπορεί να γίνει (3) αν ξέρουμε την υδατοδιαλυτότητα (s) της ουσίας μέσω της σχέσης:

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 (r^2 = 0,994) \quad [\text{εξίσωση 2}]$$

όπου s = διαλυτότητα (moles/l) : (n=36)

Οι σχέσεις αυτές εφαρμόζονται μόνον σε ουσίες με τιμές $\log P_{ow}$ μεταξύ 2 και 6,5 (4).

Ο χρόνος για να φθάσουμε σε κάποιο ποσοστό σταθερής κατάστασης μπορεί να υπολογιστεί, χρησιμοποιώντας την εξ. εκτιμήσεως τιμή της k_2 , από τη γενική κινητική εξίσωση που περιγράφει την πρόσληψη και αποβολή (κινητική πρώτης τάξεως):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

ή εάν η C_w είναι σταθερά:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{εξίσωση 3}]$$

Όταν έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση ($t \rightarrow \infty$), η εξίσωση 3 μπορεί να γίνει (5)(6):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{ή} \quad C_f / C_w = k_1 / k_2 = \Sigma \Sigma$$

Τότε η $k_1/k_2 \cdot C_w$ είναι μία προσέγγιση της συγκέντρωσης στο ψάρι σε "σταθερή κατάσταση" ($C_{f,s}$).

Η εξίσωση 3 μπορεί να γραφεί ως:

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{οr} \quad \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{εξίσωση 4}]$$

Εφαρμόζοντας την εξίσωση 4, μπορεί να προβλεφθεί ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη κάποιου ποσοστού σταθερής κατάστασης όταν έχει προεκτιμηθεί η k_2 με την εξίσωση 1 ή 2.

Κατά κανόνα, η στατιστικός άριστη διάρκεια της φάσης πρόσληψης για τη λήψη στατιστικώς αποδεκτών δεδομένων (ΣΒΚκ) είναι το διάστημα εκείνο που απαιτείται ώστε η καμπύλη του λογαρίθμου της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια που χαράσσεται συναρτήσει του χρόνου να φθάσει στο μέσο της, ή $1,6/k_2$, ή το 80% της σταθερής κατάστασης αλλά όχι περισσότερο από $3,0/k_2$ ή το 95% της σταθερής κατάστασης (7).

Ο χρόνος που απαιτείται για να φθάσουμε στο 80% της σταθερής κατάστασης είναι (εξίσωση 4):

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{ή} \quad t_{80} = \frac{1.6}{k_2} \quad [\text{εξίσωση 5}]$$

Ομοίως, η αντίστοιχη εξίσωση για το 95% της σταθερής κατάστασης είναι :

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2} \quad [\text{εξίσωση 6}]$$

Για παράδειγμα, η διάρκεια της φάσης πρόσληψης για μία υπό δοκιμή ουσία με $\log P_{ow}=4$ θα είναι (εφαρμόζοντας τις εξισώσεις 1,5,6):

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0.414 \cdot (4) + 1.47 & k_2 &= 0.652 \text{ ημέρες}^{-1} \\ \text{προσλ.}(80\%) &= 1.6/0.652, \text{ δηλ. } 2.45 \text{ ημέρες (59 ώρες)} \\ \text{ή} \quad \text{προσλ.}(95\%) &= 3.0/0.652, \text{ δηλ. } 4.60 \text{ ημέρες (110 ώρες)} \end{aligned}$$

Ομοίως, για μία υπό δοκιμή ουσία με $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ($\log(s) = -5.0$), η διάρκεια της πρόσληψης θα είναι (εφαρμόζοντας τις εξισώσεις 1,2,5,6)

$$\begin{aligned} \log_{10} (P_{ow}) &= & -0.862 (-5.0) + 0.710 &= 5.02 \\ \log_{10} K_2 &= & -0.414 (5.02) + 1.47 & \\ k_2 &= & 0.246 \text{ ημέρες}^{-1} & \\ \text{προσλ.}(80\%) &= & 1.6/0.246, \text{ δηλ. } 6.5 \text{ ημέρες (156 ώρες)} & \\ \text{ή} \quad \text{προσλ.}(95\%) &= & 3.0/0.246, \text{ δηλ. } 12.2 \text{ ημέρες (293 ώρες)} & \end{aligned}$$

Εναλλακτικώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η έκφραση:

$$t_{eq} = 6.54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55.31 \text{ (ώρες)}$$

για τον υπολογισμό του χρόνου που απαιτείται για την επίτευξη ικανής σταθερής κατάστασης (4).

2. Πρόβλεψη της διάρκειας της φάσης αποβολής

Μία πρόβλεψη του χρόνου που απαιτείται για να μειωθεί το σωματικό φορτίο σε ένα ορισμένο ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης μπορεί επίσης να ληφθεί και από την γενική εξίσωση που περιγράφει την πρόσληψη και την αποβολή (κινητική πρώτης τάξεως)(1)(8)

Για τη φάση αποβολής, η C_w υποτίθεται ότι είναι μηδέν. Η εξίσωση μπορεί να αναχθεί σε:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{ή} \quad C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

όπου $C_{f,o}$ είναι η συγκέντρωση στην αρχή της περιόδου αποβολής. Ποσοστό 50% αποβολής επιτυγχάνεται κατά τη χρονική στιγμή (t_{50}) :

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{ή} \quad t_{50} = \frac{0.693}{k_2}$$

Ομοίως, ποσοστό αποβολής 95% επιτυγχάνεται κατά τη χρονική στιγμή:

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$$

Εάν για την πρώτη περίοδο εφαρμόζεται 80% πρόσληψη ($1,6/k_2$) και 95% απώλεια κατά τη φάση αποβολής ($3,0/k_2$), τότε η φάση αποβολής είναι περίπου διπλάσια της διάρκειας της φάσης πρόσληψης.

Αξίζει να σημειωθεί εντούτοις ότι οι εκτιμήσεις βασίζονται στην υπόθεση ότι οι φάσεις πρόσληψης και αποβολής ακολουθούν κινητική πρώτης τάξεως. Εάν είναι προφανές ότι δεν ακολουθείται κινητική πρώτης τάξεως, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πολυπλοκότερα μοντέλα (π.χ. παραπομπή (1)).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (παραρτήματος 3)

- 1) **Spacie A.** and Mamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* **1**, σελ. 309-320.
- 2) **Kristensen P.** (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
- 3) **Chiou C.T.** and Schmeding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **16**, (1), σελ. 4-10.
- 4) **Hawker D.W.** and Connel D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* **22** (6), σελ. 701-707.
- 5) **Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C.** and Neely W.B. (1975) *Transactions of the American Fisheries Society*, **104**, (4), σελ. 785-792.
- 6) **Ernst W.** (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheeman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 σελ. 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd N.Y.
- 7) **Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R.** and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.* 55, σελ. 614-622.
- 8) **Könemann H.** and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, **9**, σελ. 3-19.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΔΟΚΙΜΕΣ

ΒΙΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ $\log P_{ow}=4$

Δειγματοληψία ψαριών	Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψιών		Αριθμός δειγμάτων νερού	Αριθμός ψαριών ανά δείγμα
	Ελάχιστη απαιτούμενη συχνότητα (ημέρες)	Πρόσθετη δειγματοληψία		
Φάση πρόσληψης	-1 0		2* 2	προσθ.45-80 ψάρια
1η	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2η	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3η	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4η	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5η	4,7		2	6
Φάση αποβολής				Μεταφορά ψαριών σε νερό χωρίς υπό δοκιμή ουσία
6η	5,0	5,3		4 (4)
7η	5,9	7,0		4 (4)
8η	9,3	11,2		4 (4)
9η	14,0	17,5		6 (4)

* Δειγματοληψία έπεται από παροχή νερού όγκου τουλάχιστον 3 θαλάμων

Οι τιμές σε παρενθέσεις είναι αριθμοί δειγμάτων (νερού, ψαριών) που πρέπει να λαμβάνονται εάν διενεργείται πρόσθετη δειγματοληψία

Σημείωση: Η προεκτίμηση της k_2 για $\log P_{ow}$ 4,0 είναι $0,652 \text{ ημέρες}^{-1}$. Η συνολική διάρκεια του πειράματος ορίζεται σε

$3 \times \text{προσλ.} = 3 \times 4,6 \text{ ημέρες δηλ. } 14 \text{ ημέρες}$. Για την εκτίμηση της πρόσληψης βλ. παράρτημα 3.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

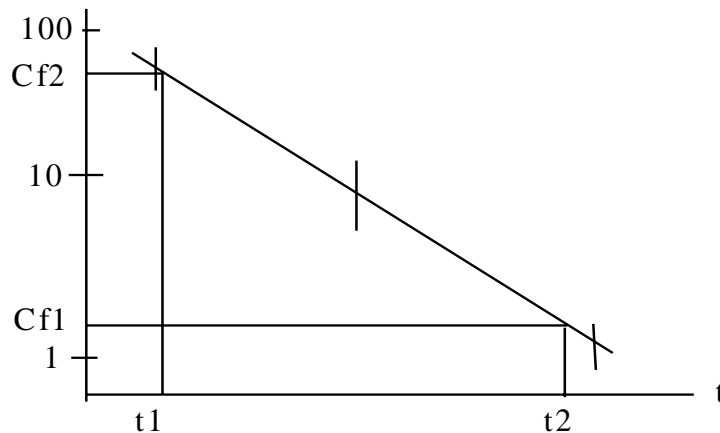
ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΜΟΝΤΕΛΩΝ

Τα περισσότερα από τα δεδομένα βιοσυγκέντρωσης υποτίθεται ότι περιγράφονται “λογικά” καλά από ένα απλό μοντέλο δύο διαμερισμάτων/δύο παραμέτρων, όπως φαίνεται από την ευθύγραμμη καμπύλη που προσεγγίζει τα σημεία των συγκεντρώσεων στα ψάρια, κατά τη διάρκεια της φάσης αποβολής, όταν αυτά σημειώνονται σε ημιλογαριθμικό χάρτη. (Όπου τα σημεία αυτά δεν μπορούν να περιγραφούν από ευθύγραμμη καμπύλη τότε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο πολύπλοκα μοντέλα, βλ., π.χ., Spacie and Hamelink, Παραπομπή 1 του παραρτήματος 3)

ΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΡΥΘΜΟΥ ΑΠΟΒΟΛΗΣ (ΑΠΩΛΕΙΑΣ) k_2

Σε ημιλογαριθμικό χάρτη σχεδιάζεται η γραφική παράσταση των τιμών των συγκεντρώσεων της ευρεθείσας υπό δοκιμή ουσίας σε κάθε δείγμα ψαριών συναρτήσει του χρόνου δειγματοληψίας. Η κλίση της γραμμής αυτής είναι k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Σημειώστε ότι αν τυχόν η καμπύλη αποκλίνει από τη μορφή ευθείας γραμμής αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η φάση της αποβολής ακολουθεί πολύπλοκότερη κινητική από εκείνη της πρώτης τάξεως. Για τη μελέτη κινητικών αποβολής που αποκλίνουν από την κινητική πρώτης τάξεως μπορεί να εφαρμοστεί κάποια γραφική μέθοδος.

ΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΡΥΘΜΟΥ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ k_1

Εφόσον είναι γνωστή η k_2 , η k_1 υπολογίζεται ως εξής:

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w x(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{εξίσωση 1}]$$

Η τιμή της C_f βρίσκεται από το μέσον της ομαλής καμπύλης πρόσληψης που κατασκευάζεται από τα δεδομένα όταν χαράσσεται η λογαριθμική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου (σε αριθμητική κλίμακα).

ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ Η.Υ. ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΡΥΘΜΟΥ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΒΟΛΗΣ (ΑΠΩΛΕΙΑΣ)

Η προτιμώμενη μέθοδος για την εύρεση του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης και των σταθερών ρυθμού k_1 και k_2 είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Με τα προγράμματα αυτά βρίσκονται οι τιμές των k_1 και k_2 εφόσον υπάρχει μία σειρά διαδοχικών χρονικών δεδομένων συγκεντρώσεως και το μοντέλο:

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{εξίσωση 2}]$$

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{εξίσωση 3}]$$

όπου t_c = ο χρόνος στο τέλος της φάσης πρόσληψης.

Η προσέγγιση αυτή παρέχει κατ' εκτίμηση τιμές τυπικής απόκλισης των k_1 και k_2

Δεδομένου ότι στις περισσότερες περιπτώσεις το k_2 μπορεί να εκτιμηθεί από την καμπύλη αποβολής με σχετικώς υψηλή ακρίβεια, και επειδή λόγω του ισχυρού συσχετισμού που υπάρχει μεταξύ των δύο παραμέτρων τα k_1 και k_2 αν εκτιμώνται ταυτόχρονα, μπορεί να είναι προτιμότερο να υπολογιστεί πρώτα η k_2 μόνον από τα δεδομένα αποβολής και στη συνέχεια να υπολογιστεί η k_1 από τα δεδομένα πρόσληψης χρησιμοποιώντας μη γραμμική αναγωγή.

C.14. ΔΟΚΙΜΗ ΝΕΑΝΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΨΑΡΙΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η δοκιμή αυτή τοξικότητας κατά την ανάπτυξη αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 215 (2000).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα δοκιμή αποσκοπεί στην εκτίμηση των επιπτώσεων της παρατεταμένης έκθεσης σε χημικές ουσίες επί της ανάπτυξης νεαρών ψαριών. Βασίζεται σε μέθοδο, η οποία αναπτύχθηκε και δοκιμάστηκε διεργαστηριακά (1)(2) στην Ευρωπαϊκή Ένωση, για την εκτίμηση της επίδρασης χημικών ουσιών στην ανάπτυξη νεαρών ατόμων ιριδιζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) υπό συνθήκες συνεχούς ροής. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα καλώς τεκμηριωμένα είδη. Για παράδειγμα, υπάρχουν εμπειρίες από παρόμοιες δοκιμές με ζεβρόψαρα (*Danio rerio*)¹ (3)(4) και ρυζόψαρα (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

Βλ. επίσης Γενική Εισαγωγή Μέρος Γ.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίδραση (LOEC): είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στην οποία παρατηρείται σημαντική επίδραση της ουσίας (με $p < 0.05$) όταν συγκρίνεται με τον μάρτυρα. Όλες όμως οι χρησιμοποιούμενες στη δοκιμή πάνω από την LOEC συγκεντρώσεις πρέπει να έχουν επιβλαβή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC.

Συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC): είναι η αμέσως κάτω από την LOEC συγκέντρωση δοκιμής.

EC_x: στην παρούσα μέθοδο δοκιμής, είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας η οποία προκαλεί x % απόκλιση στο βαθμό ανάπτυξης του ψαριού σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Πληθυσμιακός φόρτος: είναι το υγρό βάρος των ψαριών κατ' όγκο νερού.

Πυκνότητα πληθυσμού: είναι ο αριθμός των ψαριών κατ' όγκο νερού.

Ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης μεμονωμένου ψαριού: εκφράζει το βαθμό ανάπτυξης ενός μεμονωμένου ατόμου με βάση το αρχικό του βάρος.

Μέσος ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης δεξαμενής: εκφράζει το μέσο βαθμό ανάπτυξης του πληθυσμού μιας δεξαμενής σε μια ορισμένη συγκέντρωση.

Ψευδο ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης: εκφράζει το βαθμό ανάπτυξης μεμονωμένου ατόμου σε σύγκριση με το μέσο αρχικό βάρος του πληθυσμού μιας δεξαμενής.

¹ Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Νεαρά ψάρια στη φάση της εκθετικής ανάπτυξης φέρονται, αφού ζυγιστούν, σε θαλάμους δοκιμής και εκτίθενται σε μια σειρά υποθανατηφόρων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας διαλελυμένης σε νερό, κατά προτίμηση υπό συνθήκες συνεχούς ροής ή, αν δεν είναι δυνατό, υπό κατάλληλες ημιστατικές (στατική ανανέωση) συνθήκες. Η διάρκεια της δοκιμής είναι 28 ημέρες. Τα ψάρια τρέφονται καθημερινά. Το σιτηρέσιο βασίζεται στα αρχικά βάρη των ψαριών και μπορεί να αναπροσαρμοστεί μετά από 14 ημέρες. Στο τέλος της δοκιμής, τα ψάρια ξαναζυγίζονται. Οι επιπτώσεις στο βαθμό ανάπτυξης αναλύονται χρησιμοποιώντας μοντέλο αναγωγής για να εκτιμηθεί η συγκέντρωση που μπορεί να προκαλέσει x % απόκλιση στο βαθμό ανάπτυξης, δηλ. EC_x (π.χ. EC_{10} , EC_{20} ή EC_{30}). Εναλλακτικά, τα δεδομένα μπορούν να συγκριθούν με τιμές μαρτύρων για να προσδιοριστεί η κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίδραση (LOEC) και, κατά συνέπεια, η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC).

1.4 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα τα αποτελέσματα δοκιμής οξείας τοξικότητας (βλ. μέθοδο δοκιμής Γ.1) πραγματοποιηθείσας, κατά προτίμηση, με το είδος που επιλέχθηκε για τη δοκιμή αυτή. Αυτό σημαίνει ότι η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της υπό δοκιμή ουσίας είναι γνωστές και υπάρχει διαθέσιμη αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα διαλύματα δοκιμής με γνωστή και δημοσιευμένη ορθότητα (accuracy) και όριο ανίχνευσης.

Στις χρήσιμες πληροφορίες περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα της ουσίας, η σταθερότητα στο νερό και το φως, η pK_a , η P_{ow} και αποτελέσματα δοκιμής ως προς την άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (βλ. μέθοδο δοκιμής Γ. 4).

1.5 ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, επιβάλλονται οι ακόλουθες συνθήκες:

- η θνησιμότητα στον ή στους μάρτυρες να μην υπερβαίνει το 10 % στο τέλος της δοκιμής,
- το μέσο βάρος των ψαριών στον ή στους μάρτυρες να έχει αυξηθεί αρκετά ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός της ελάχιστης απόκλισης του βαθμού ανάπτυξης που θεωρείται ως στατιστικώς σημαντική. Διεργαστηριακές δοκιμές (2) έχουν δείξει ότι για την ιριδίζουσα πέστροφα, το μέσο βάρος των ψαριών στους μάρτυρες πρέπει να έχει αυξηθεί τουλάχιστον κατά το ήμισυ (δηλ. κατά 50 %) του μέσου αρχικού τους βάρους μέσα σε 28 ημέρες, π.χ., αρχικό βάρος 1 g/ψάρι (= 100 %), τελικό βάρος μετά 28 ημέρες: ≥ 1.5 g/ψάρι (≥ 150 %);
- η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου να είναι τουλάχιστον το 60 % της τιμής κορεσμού σε αέρα (TKA) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής,
- η θερμοκρασία του νερού μεταξύ των θαλάμων δοκιμής να μη διαφέρει περισσότερο του ± 1 °C σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της δοκιμής και να διατηρείται με δυνατότητα απόκλισης 2 °C στην περιοχή των θερμοκρασιών που ορίζεται για το υπό δοκιμή είδος (Παράρτημα 1).

1.6 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1 Εξοπλισμός

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

- α) οξυγονόμετρο και pH-μετρο,
- β) εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και αλκαλικότητας του νερού,
- γ) κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο της θερμοκρασίας με δυνατότητα συνεχούς, κατά προτίμηση, παρακολούθησης,
- δ) δεξαμενές κατασκευασμένες από χημικά αδρανές υλικό και κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τη συνιστώμενη φόρτιση και την πυκνότητα πληθυσμού (βλ. σημείο 1.8.5 και παράρτημα 1),
- ε) ζυγός κατάλληλης ορθότητας (δηλ. ορθότητα έως ± 0.5 %).

1.6.2 Νερό

Ως νερό δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε νερό στο οποίο το υπό δοκιμή είδος εμφανίζει την ενδεδειγμένη μακροπρόθεσμη επιβίωση και ανάπτυξη. Θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6.5 έως 8.5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να κυμαίνεται πέραν των ± 0.5 μονάδων pH. Η σκληρότητα συνιστάται να είναι πάνω από 140 mg/l (ως CaCO₃). Για να εξασφαλίζεται ότι το νερό αραίωσης δεν θα επηρεάσει το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. με τη δημιουργία συμπλόκων με την υπό δοκιμή ουσία), θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν το νερό αραίωσης είναι γνωστό ως σχετικώς σταθερό από ποιοτικής πλευράς, θα πρέπει, π.χ. κάθε τρεις μήνες, να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd και Ni), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca, Mg, Na, K, Cl και SO₄), γεωργικών φαρμάκων (π.χ. συνολικών οργανοφωσφορικών και συνολικών οργανοχλωριούχων φαρμάκων), ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών σωματιδίων. Εάν η ποιότητα του νερού έχει αποδειχθεί ότι μένει σταθερή για ένα, τουλάχιστον, χρόνο, τότε οι μετρήσεις μπορούν να γίνονται σε αραιότερα χρονικά διαστήματα (π.χ. κάθε 6 μήνες). Μερικά χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραίωσης καταγράφονται στο παράρτημα 2.

1.6.3 Διαλύματα δοκιμής

Τα διαλύματα δοκιμής των επιλεγόμενων συγκεντρώσεων παρασκευάζονται με αραίωση αρχικού διαλύματος.

Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό του διαλύματος, χρησιμοποιώντας μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση ή υπερήχους). Για την επίτευξη κατάλληλου πυκνού αρχικού διαλύματος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες κορεσμού (στήλες διαλυτότητας).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, για την παρασκευή κατάλληλου πυκνού αρχικού διαλύματος, μπορεί να απαιτείται η χρήση διαλυτών ή διασπартικών μέσων (μέσων διαλυτοποίησης). Παραδείγματα κατάλληλων διαλυτών αποτελούν η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, το διμεθυλοσουλφοξείδιο, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαθυλενογλυκόλη. Παραδείγματα κατάλληλων διασπартικών μέσων είναι τα Cremophor RH40, Tween 80, Methylcellulose 0.01 % και HCO-40. Όταν χρησιμοποιούνται ευκόλως βιοαποικοδομήσιμα μέσα (π.χ. ακετόνη) και/ή λίαν πτητικές ενώσεις, θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή καθώς είναι ενδεχόμενο, σε δοκιμές συνεχούς ροής, να προκληθούν προβλήματα με ανάπτυξη βακτηρίων. Όταν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, αυτό δεν πρέπει να εμφανίζει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των ψαριών, ούτε ορατά δυσμενή αποτελέσματα στα νεαρά ψάρια που να μπορούν να γίνουν αντιληπτά με απλό και μόνο έλεγχο του διαλύτη.

Στην περίπτωση δοκιμών συνεχούς ροής, για την επίτευξη των διαφόρων συγκεντρώσεων στους θαλάμους δοκιμών, απαιτείται σύστημα το οποίο να προσάγει συνεχώς και να αραιώνει αρχικό διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας (π.χ. μετρητική αντλία, αναλογικό αραιωτή, σύστημα κορεσμού). Οι ταχύτερες ροές των αρχικών διαλυμάτων και του νερού αραιώσης θα πρέπει να ελέγχονται κατά διαστήματα, κατά προτίμηση κάθε μέρα, κατά τη διάρκεια της δοκιμής και δεν θα πρέπει να κυμαίνονται περισσότερο από 10 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Διεργαστηριακή δοκιμή (2) έδειξε ότι, όσον αφορά την ιριδιζουσα πέστροφα, συχνότητα απομάκρυνσης νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής της τάξης των 6 λίτρων/g ψαριού/ημέρα είναι αποδεκτή (βλ. σημείο 1.8.2.2).

Σε ημιστατικές (ανανέωσης) δοκιμές, η συχνότητα μέσης ανανέωσης εξαρτάται από τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας, συνιστάται όμως η καθημερινή ανανέωση του νερού. Εάν, από προκαταρκτικές δοκιμές σταθερότητας (βλ. σημείο 1.4), η συγκέντρωση της υπό δοκιμής ουσίας δεν είναι σταθερή (δηλ. είναι εκτός της περιοχής του 80 - 120 % της ονομαστικής ή πέφτει κάτω από το 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης) κατά την περίοδο ανανέωσης, θα πρέπει να εξετάζεται η περίπτωση χρήσης της δοκιμής συνεχούς ροής.

1.6.4 Επιλογή του είδους

Για την παρούσα δοκιμή, το συνιστώμενο είδος είναι η ιριδιζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), επειδή υπάρχουν μεγαλύτερες εμπειρίες για το είδος αυτό από διεργαστηριακές δοκιμές (1)(2). Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα καλώς τεκμηριωμένα είδη, η διαδικασία όμως δοκιμής μπορεί να πρέπει να προσαρμοστεί για να ληφθούν οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμής. Για παράδειγμα, εμπειρίες υπάρχουν και από τα ζεβρόψαρα (*Danio rerio*) (3)(4) και από τα ρυζόψαρα (*medaka, Oryzias latipes*) (5)(6)(7). Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να αναφέρεται η αιτιολογία της επιλογής του είδους και η πειραματική μέθοδος.

1.1.5 Διατήρηση των ψαριών

Τα προς δοκιμή ψάρια επιλέγονται από μεμονωμένο αρχικό πληθυσμό, κατά προτίμηση της αυτής φωτοκίας, που έχει διατηρηθεί για δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από τη δοκιμή, υπό συνθήκες ποιότητας νερού και φωτισμού παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Θα πρέπει να διατρέφονται με σιτηρέσιο αντιστοιχούν κατ' ελάχιστο στο 2 % βάρους σώματος ανά ημέρα και, κατά προτίμηση, στο 4 % βάρους σώματος ανά ημέρα, καθ' όλη την περίοδο διατήρησης και κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Αφού περάσει ένα προκαταρκτικό 48-ωρο διάστημα, καταγράφονται τα ποσοστά θνησιμότητας και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

- ποσοστά θνησιμότητας άνω του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα
- ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ 5 % και 10 % του πληθυσμού: εγκλιματισμός για επτά ακόμη ημέρες. Εάν, κατά τη διάρκεια των επτά επόμενων ημερών, καταγραφεί ποσοστό θνησιμότητας άνω του 5 %, ολόκληρη η παρτίδα απορρίπτεται
- ποσοστά θνησιμότητας λιγότερο από το 5 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: η παρτίδα γίνεται αποδεκτή.

Τις δύο εβδομάδες που προηγούνται ή κατά τη διάρκεια της δοκιμής, τα ψάρια δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή για ασθένεια.

Ο όρος 'σχέδιο δοκιμής' αναφέρεται στην επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, στον αριθμό των δεξαμενών για κάθε συγκέντρωση και στον αριθμό των ψαριών ανά δεξαμενή. Θεωρητικά, το σχέδιο δοκιμής θα πρέπει να επιλέγεται ανάλογα με:

- α) το στόχο της μελέτης,
- β) τη μέθοδο στατιστικής ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί,
- γ) τη διαθεσιμότητα και το κόστος των πόρων του πειράματος.

Στη δήλωση του στόχου θα πρέπει, αν είναι δυνατόν, να προσδιορίζεται η στατιστική ισχύς με την οποία απαιτείται να ανιχνευθεί ένα δεδομένο εύρος διαφοράς (π.χ. στο βαθμό ανάπτυξης) ή, εναλλακτικά, η ακρίβεια με την οποία απαιτείται να εκτιμηθεί η EC_x (π.χ. με $x = 10, 20$ ή 30 και, κατά προτίμηση, όχι λιγότερο από 10). Χωρίς αυτό, δεν μπορεί να δοθεί σταθερή προδιαγραφή του μεγέθους της μελέτης.

Είναι σημαντικό να γίνει αντιληπτό ότι ένα σχέδιο που είναι άριστο (επιτυγχάνει τη βέλτιστη χρήση πόρων) για χρήση με μια μέθοδο στατιστικής ανάλυσης δεν είναι, κατ' ανάγκη, άριστο και για μιαν άλλη. Το συνιστώμενο σχέδιο για την εκτίμηση μιας τιμής LOEC/NOEC μπορεί, συνεπώς, να μην είναι ίδιο με εκείνο που συνιστάται για τη μέθοδο της ανάλυσης με αναγωγή (analysis by regression).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανάλυση με αναγωγή είναι προτιμότερη από την ανάλυση μεταβλητότητας (analysis of variance), για λόγους που αναφέρονται από τους Stephan και Rogers (8). Εντούτοις, όταν δεν βρίσκεται κατάλληλο μοντέλο αναγωγής ($r^2 < 0.9$), θα πρέπει να χρησιμοποιείται η τιμή NOEC/LOEC.

1.7.1

Σχέδιο για ανάλυση με αναγωγή

Τα σημεία που πρέπει να λαμβάνονται ιδιαίτερα υπόψη στο σχέδιο δοκιμής στην οποία θα εφαρμοστεί ανάλυση με αναγωγή είναι:

- α) Η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. $EC_{10,20,30}$) και η περιοχή των συγκεντρώσεων η οποία ενδιαφέρει σε σχέση με την επίδραση της υπό δοκιμή ουσίας, θα πρέπει, κατ' ανάγκη, να καλύπτεται από τις συγκεντρώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Άριστη ακρίβεια στις εκτιμήσεις των συγκεντρώσεων επίδρασης επιτυγχάνεται αν η συγκέντρωση επίδρασης βρίσκεται στο μέσον της περιοχής συγκεντρώσεων της δοκιμής. Για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής, ιδιαίτερα χρήσιμη μπορεί να αποδειχθεί η πραγματοποίηση μιας προκαταρκτικής δοκιμής προσανατολισμού.
- β) Για την επίτευξη ικανοποιητικής στατιστικής εικόνας, η δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει μία τουλάχιστον δεξαμενή-μάρτυρα και πέντε επιπλέον δεξαμενές με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Όπου χρειάζεται, όταν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, εκτός από τη σειρά δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιείται και μάρτυρας που να περιέχει το μέσο διαλυτοποίησης στην υψηλότερη υπό δοκιμή συγκέντρωση (βλ. σημεία 1.8.3 και 1.8.4).
- γ) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλη γεωμετρική ή λογαριθμική σειρά (9) (βλ. παράρτημα 3). Προτιμάται η χρησιμοποίηση λογαριθμικής κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής.
- δ) Εάν υπάρχουν διαθέσιμες περισσότερες από έξι δεξαμενές, οι επιπλέον δεξαμενές θα πρέπει ή να χρησιμοποιούνται για επανάληψη, ή να κατανέμονται στην περιοχή συγκεντρώσεων για να επιτυγχάνεται πυκνότερη κλιμάκωση των επιπέδων συγκέντρωσης. Οποιοδήποτε από τα δύο, είναι εξίσου επιθυμητό.

1.7.2 Σχέδιο υπολογισμού τιμής NOEC/LOEC με τη μέθοδο της αναλύσεως μεταβλητότητας (ANOVA)

Για κάθε συγκέντρωση θα πρέπει, κατά προτίμηση, να υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης, η δε στατιστική ανάλυση θα πρέπει να γίνεται σε επίπεδο δεξαμενής (10). Χωρίς δεξαμενές επανάληψης, δεν μπορεί να γίνει δεκτή καμμία μεταβλητότητα μεταξύ δεξαμενών πέραν εκείνης που οφείλεται σε μεμονωμένα ψάρια. Εντούτοις, η εμπειρία έχει δείξει (11) ότι η μεταξύ δεξαμενών μεταβλητότητα είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με την εντός δεξαμενής (δηλ. μεταξύ ψαριών) μεταβλητότητα στην εξεταζόμενη περίπτωση. Συνεπώς, μια σχετικώς αποδεκτή εναλλακτική λύση είναι η εκτέλεση στατιστικής αναλύσεως σε επίπεδο μεμονωμένων ψαριών.

Συμβατικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής σε γεωμετρική σειρά με λόγο, κατά προτίμηση, μη υπερβαίνοντα το 3,2.

Γενικά, όταν εκτελούνται δοκιμές με δεξαμενές επανάληψης, ο αριθμός των δεξαμενών-μαρτύρων επανάληψης και, κατά συνέπεια, ο αριθμός των ψαριών θα πρέπει να είναι διπλάσιος από τον αριθμό που υπάρχει σε κάθε μία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, που θα πρέπει να είναι του αυτού μεγέθους(12)(13)(14). Αντίθετα, εφόσον δεν υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης, ο αριθμός των ψαριών στην ομάδα των μαρτύρων θα πρέπει να είναι ίδιος με τον αριθμό σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής.

Εάν η ANOVA πρόκειται να βασιστεί σε δεξαμενές και όχι σε μεμονωμένα ψάρια (πράγμα που σημαίνει είτε την κατ' άτομο σήμανση των ψαριών, είτε τη χρήση 'ψευδο' ιδιαίτερων βαθμών ανάπτυξης (βλ. σημείο 2.1.2)), είναι ανάγκη να υπάρχουν αρκετές δεξαμενές επανάληψης για να μπορεί να προσδιοριστεί η τυπική απόκλιση των «εντός δεξαμενής συγκεντρώσεων». Αυτό σημαίνει ότι οι βαθμοί ελευθερίας σφάλματος στην ανάλυση αποκλίσεων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 5 (10). Εάν μόνο για τους μάρτυρες υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης, υπάρχει κίνδυνος αποκλίσεων στη μεταβλητότητα σφάλματος, επειδή αυτή μπορεί να αυξάνεται με τη μέση τιμή του υπό εξέταση βαθμού ανάπτυξης. Εφόσον ο βαθμός ανάπτυξης είναι πιθανόν να μειωθεί με την αύξηση της συγκεντρώσεως, αυτό θα τείνει να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της μεταβλητότητας.

1.8 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.8.1 Επιλογή και ζύγιση των υπό δοκιμή ψαριών

Είναι σημαντικό να ελαχιστοποιείται η διακύμανση του βάρους των ψαριών στην αρχή της δοκιμής. Κατάλληλες περιοχές μεγεθών για τα διάφορα είδη που συνιστώνται για χρήση στη δοκιμή αυτή, δίνονται στο παράρτημα 1. Για το σύνολο της παρτίδας ψαριών που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, το εύρος των ατομικών βαρών στην έναρξη της δοκιμής θα πρέπει, θεωρητικά, να κρατιέται στα όρια του $\pm 10\%$ του αριθμητικού μέσου βάρους, σε κάθε δε περίπτωση, δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 25%. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα ψαριών, για να εκτιμάται το μέσο βάρος.

Τα 24 ώρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, θα πρέπει να μην δίνεται τροφή στον αρχικό πληθυσμό. Τα ψάρια θα πρέπει κατόπιν να επιλέγονται στην τύχη. Χρησιμοποιώντας ένα γενικό αναισθητικό (π.χ. υδατικό διάλυμα 100 mg/l μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης (MS 222) εξουδετερωμένο με προσθήκη δύο μερών διτανθρακικού νατρίου ανά μέρος MS 222), τα ψάρια θα πρέπει να ζυγίζονται κατ' άτομο για την εύρεση του υγρού βάρους (στέγνωμα με στυπόχαρτο) με την ακρίβεια που προβλέπεται στο παράρτημα 1. Όσα ψάρια έχουν βάρος εντός της προβλεπόμενης περιοχής θα πρέπει να κρατιούνται και κατόπιν να κατανέμονται τυχαία μεταξύ των δοχείων δοκιμής. Το συνολικό υγρό βάρος των ψαριών σε κάθε δοχείο δοκιμής θα πρέπει να καταγράφεται. Η χρήση του αναισθητικού, όπως και η μεταχείριση των ψαριών (συμπεριλαμβανομένης της στύπωσης και της ζύγισης), μπορεί να προκαλέσει άγχος και τραυματισμούς στα νεαρά ψάρια, ιδιαίτερα στα είδη εκείνα που είναι μικρού μεγέθους. Συνεπώς, ο χειρισμός των νεαρών ψαριών πρέπει να γίνεται με ύψιστη προσοχή, ώστε να αποφεύγονται άγχη και τραυματισμοί για τα υπό δοκιμή ζώα.

Τα ψάρια ζυγίζονται πάλι την 28η ημέρα της δοκιμής (βλ. σημείο 1.8.6). Εντούτοις, εάν κριθεί αναγκαίο να επανυπολογιστεί το σιτηρέσιο, τα ψάρια μπορούν να ζυγιστούν πάλι την 14η ημέρα της δοκιμής (βλ. σημείο 1.8.2.3). Για τον προσδιορισμό των μεταβολών στο μέγεθος των ψαριών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και άλλη μέθοδος, όπως η φωτογραφική μέθοδος, μέσω της οποίας μπορεί να προσαρμωστεί το σιτηρέσιο.

1.8.2 Συνθήκες έκθεσης

1.8.2.1 Διάρκεια

Η διάρκεια της δοκιμής είναι ≥ 28 ημερών.

1.8.2.2 Πληθυσμιακός φόρτος και πυκνότητα πληθυσμού

Είναι σημαντικό, ο πληθυσμιακός φόρτος και η πυκνότητα πληθυσμού να είναι κατάλληλα για το χρησιμοποιούμενο είδος ψαριών (βλ. παράρτημα 1). Εάν η πυκνότητα πληθυσμού είναι πολύ υψηλή, τότε δημιουργείται συμφορητικό άγχος που οδηγεί σε μείωση του βαθμού ανάπτυξης και, ενδεχομένως, στην εμφάνιση ασθενειών. Εάν είναι πολύ χαμηλή, μπορεί να προκληθεί χωροκατακτητική συμπεριφορά που μπορεί, επίσης, να επιδράσει στην ανάπτυξη. Σε κάθε περίπτωση, ο πληθυσμιακός φόρτος θα πρέπει να είναι αρκετά χαμηλός για να μπορεί να διατηρείται, χωρίς αερισμό, συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου τουλάχιστον 60 % ΤΚΑ. Διεργαστηριακή δοκιμή (2) έχει δείξει ότι, για την ιριδίζουσα πέστροφα, πληθυσμιακός φόρτος της τάξης των 16 ατόμων των 3-5 g σε όγκο 40 λίτρων, είναι αποδεκτός. Η συνιστώμενη συχνότητα απομάκρυνσης νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής είναι 6 λίτρα/g ψαριών/ημέρα.

1.8.2.3 Διατροφή

Τα ψάρια θα πρέπει να διατρέφονται με κατάλληλη τροφή (παράρτημα 1) και σε επίπεδα επαρκή για την επίτευξη αποδεκτού βαθμού ανάπτυξης. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η ανάπτυξη μικροβίων και η εμφάνιση θολότητας στο νερό. Στην περίπτωση της ιριδίζουσας πέστροφας, επίπεδα της τάξης του 4 % του σωματικού τους βάρους ανά ημέρα ικανοποιεί πιθανόν αυτές τις συνθήκες (2)(15)(16)(17). Το ημερήσιο σιτηρέσιο μπορεί να διαιρείται σε δύο ίσα μέρη και να δίνεται στα ψάρια σε δύο δόσεις την ημέρα, διαχωριζόμενες από χρονικό διάστημα 5 τουλάχιστον ωρών. Το σιτηρέσιο βασίζεται στο αρχικό συνολικό βάρος των ψαριών για κάθε δοχείο δοκιμής. Εάν τα ψάρια ζυγιστούν πάλι τη 14η ημέρα, το σιτηρέσιο επανυπολογίζεται. Για 24 ώρες πριν από τη ζύγιση, δεν θα πρέπει να δίνεται τροφή στα ψάρια.

Τα υπολείμματα των τροφών και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοχεία δοκιμής κάθε μέρα με προσεκτικό καθαρισμό του πυθμένα κάθε δεξαμενής με ρόφηση.

1.1.1.4 Φως και θερμοκρασία

Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι κατάλληλες για το υπό δοκιμή είδος (παράρτημα 1).

1.1.3 Συγκεντρώσεις δοκιμής

Κανονικά, ανεξάρτητα από το σχέδιο δοκιμής, απαιτούνται πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας (βλ. σημείο 1.7.2). Εάν η τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας είναι γνωστή εκ των προτέρων (π.χ. από μελέτες οξείας τοξικότητας και/ή προσανατολισμού ως προς την περιοχή), αυτό μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής. Εφόσον χρησιμοποιούνται λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται. Η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας της ουσίας στο νερό.

Όταν, για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος, χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, η τελική του συγκέντρωση δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0.1 ml/l ενώ, κατά προτίμηση, θα πρέπει να είναι η ίδια σε όλα τα δοχεία δοκιμής (βλ. σημείο 1.6.3). Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια αποφυγής χρήσης παρόμοιων υλικών.

1.1.4 Μάρτυρες

Ο αριθμός των χρησιμοποιουμένων ως μαρτύρων υδατικών αραιώσεων εξαρτάται από το σχέδιο δοκιμής (βλ. σημεία 1.7-1.7.2). Εάν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιείται και ίδιος αριθμός μαρτύρων με μέσο διαλυτοποίησης με εκείνο των υδατικών αραιώσεων-μαρτύρων.

1.1.5 Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, προσδιορίζονται σε τακτικά διαστήματα οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας (βλ. κατωτέρω).

Στις δοκιμές συνεχούς ροής, θα πρέπει, κατά διαστήματα, να ελέγχονται οι ταχύτητες ροής του αραιωτικού και του τοξικού αρχικού διαλύματος, κατά προτίμηση ημερησίως, και δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν διακύμανση άνω του 10 % καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Όταν οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να παραμείνουν στα όρια του ± 20 % των ονομαστικών τιμών (δηλ. στην περιοχή του 80 - 120 %, βλ. σημεία 1.6.2 και 1.6.3), συνιστάται, στην έναρξη της δοκιμής και, στη συνέχεια, κάθε εβδομάδα, να ελέγχονται τουλάχιστον η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής. Σε δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να μην παραμείνει στα όρια του ± 20 % της ονομαστικής (με βάση τα δεδομένα σταθερότητας της υπό δοκιμή ουσίας), είναι αναγκαίο να ελέγχονται όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής, με το ίδιο καθεστώς.

Στις ημιστατικές (ανανέωσης) δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να παραμείνει στα όρια του ± 20 % των ονομαστικών τιμών, συνιστάται, κατ' ελάχιστο, να ελέγχονται η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής αμέσως μετά την παρασκευή και αμέσως πριν από την ανανέωση στην έναρξη της μελέτης και, στη συνέχεια, κάθε βδομάδα. Σε δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να μην παραμείνει στα όρια του ± 20 % της ονομαστικής, είναι αναγκαίο να ελέγχονται όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής, με το ίδιο καθεστώς όπως και για τις σταθερότερες σταθερές ουσίες.

Συνιστάται τα αποτελέσματα να βασίζονται σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Εντούτοις, εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα διατηρείται ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές.

Ορισμένα δείγματα μπορεί να χρειάζεται να διηθηθούν (π.χ. χρησιμοποιώντας διηθητικό μέσο με πόρους διαμέτρου 0.45 μm) ή να φυγοκεντρηθούν. Η μέθοδος που συνιστάται είναι η φυγοκέντρωση. Πάντως, εφόσον η υπό δοκιμή ουσία δεν απορροφάται στο φίλτρο, μπορεί να γίνει δεκτή και η διήθηση.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, σε όλα τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να μετρώνται το διαλελυμένο οξυγόνο, το pH και η θερμοκρασία. Στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με τη υψηλότερη συγκέντρωση, θα πρέπει να μετράται η ολική σκληρότητα, η αλκαλικότητα και η αλατότητα (εφόσον συντρέχει περίπτωση). Το διαλελυμένο οξυγόνο και η αλατότητα (εάν συντρέχει περίπτωση) θα πρέπει να μετρώνται κατ' ελάχιστο τρεις φορές (στην αρχή, στο μέσον και στο τέλος της δοκιμής). Στις ημιστατικές δοκιμές, συνιστάται το διαλελυμένο οξυγόνο να μετριέται συχνότερα, κατά προτίμηση πριν και μετά από κάθε ανανέωση του νερού ή, τουλάχιστον, μια φορά την εβδομάδα. Το pH θα πρέπει να μετριέται στην αρχή και στο τέλος κάθε ανανέωσης νερού σε στατικές δοκιμές ανανέωσης και μια φορά τουλάχιστον τη βδομάδα σε δοκιμές συνεχούς ροής. Η σκληρότητα και η αλκαλικότητα θα πρέπει να μετριούνται μια φορά σε κάθε δοκιμή. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα, τουλάχιστον, δοχείο δοκιμής.

1.1.6 Παρατηρήσεις

Βάρος: Στο τέλος της δοκιμής όλα τα επιζώντα ψάρια πρέπει να ζυγίζονται σε υγρή κατάσταση (στέγνωμα με στυλόχαρτο) είτε σε ομάδες κατά δοχείο δοκιμής, είτε μεμονωμένα. Η ζύγιση των ζώων κατά δοχείο δοκιμής προτιμάται από την κατ' άτομο ζύγιση που απαιτεί τη σήμανση κάθε ψαριού. Στην περίπτωση της κατ' άτομο μέτρησης του βάρους για τον προσδιορισμό του ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης μεμονωμένων ψαριών, η τεχνική σήμανσης θα πρέπει να επιλέγεται έτσι ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία άγχους στα ζώα (αντί της ψυχρής σήμανσης, μπορεί να είναι κατάλληλος κάποιος εναλλακτικός τρόπος, π.χ. η χρήση χρωματισμένης λεπτής τριχιάς).

Τα ψάρια θα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου της δοκιμής και να σημειώνεται οποιαδήποτε εξωτερική ανωμαλία (όπως, π.χ. αιμορραγία, αποχρωματισμός) και μη φυσιολογική συμπεριφορά. Θα πρέπει να σημειώνεται κάθε τυχόν περίπτωση θανάτου και τα νεκρά ψάρια να απομακρύνονται το ταχύτερο δυνατό. Τα νεκρά ψάρια δεν αντικαθίστανται, αφού ο πληθυσμιακός φόρτος και η πυκνότητα πληθυσμού επαρκούν για την αποφυγή επιδράσεων στην ανάπτυξη λόγω μεταβολής του αριθμού των ψαριών ανά δεξαμενή. Τα επίπεδα, όμως, του σιτηρεσίου θα πρέπει να προσαρμόζονται.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συνιστάται τόσο στο σχέδιο, όσο και στην ανάλυση της δοκιμής να συμμετέχει και ένας στατιστικολόγος, δεδομένου ότι η μέθοδος αυτή δοκιμής προσφέρει τη δυνατότητα σημαντικών μεταβολών στο σχεδιασμό του πειράματος όπως, π.χ., στον αριθμό των θαλάμων δοκιμής, στον αριθμό των συγκεντρώσεων δοκιμής, στον αριθμό των ψαριών, κλπ. Δεδομένου ότι στο σχέδιο δοκιμής υπάρχει δυνατότητα διάφορων επιλογών, εδώ δεν δίνονται ειδικές οδηγίες για τη στατιστική διαδικασία.

Σε δοχεία δοκιμής στα οποία η θνησιμότητα υπερβαίνει το 10 %, δεν θα πρέπει να υπολογίζονται βαθμοί ανάπτυξης. Εντούτοις, σε όλες τις συγκεντρώσεις δοκιμής, θα πρέπει να αναφέρεται το ποσοστό θνησιμότητας.

Όποια μέθοδος κι να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των δεδομένων, η κεντρική ιδέα είναι ο ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης r μεταξύ χρόνου t_1 και χρόνου t_2 . Αυτός μπορεί να οριστεί με διάφορους τρόπους, ανάλογα με το εάν τα ψάρια είναι επισημασμένα ή όχι κατ' άτομο ή με το εάν απαιτείται μέσος όρος δεξαμενής.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

όπου,

r_1	= ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης μεμονωμένων ψαριών
r_2	= μέσος ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης δεξαμενής
r_3	= 'ψευδο' ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης
w_1, w_2	= βάρη ενός συγκεκριμένου ψαριού κατά τις χρονικές στιγμές t_1 και t_2 , αντίστοιχα
$\log_e w_1$	= λογάριθμος του βάρους ενός μεμονωμένου ψαριού στην αρχή της μελέτης
$\log_e w_2$	= λογάριθμος του βάρους ενός μεμονωμένου ψαριού στο τέλος της μελέτης
$\overline{\log_e w_1}$	= μέση τιμή των λογαρίθμων των τιμών w_1 για τα ψάρια στη δεξαμενή στην αρχή της μελέτης
$\overline{\log_e w_2}$	= μέση τιμή των λογαρίθμων των τιμών w_2 για τα ψάρια στη δεξαμενή στο τέλος της μελέτης
t_1, t_2	= χρονική στιγμή (ημέρες) έναρξης και τέλους της μελέτης

Τα r_1, r_2, r_3 μπορούν να υπολογιστούν για την περίοδο 0-28η ημέρα και, όπου χρειάζεται (δηλ., όταν έχει πραγματοποιηθεί μέτρηση κατά την 14η ημέρα) για τις περιόδους 0-14η και 14-28η ημέρα.

2.1.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων με αναγωγή (μοντέλο συγκέντρωσης-απόκρισης)

Η μέθοδος αυτή ανάλυσης διαμορφώνει μια κατάλληλη μαθηματική σχέση μεταξύ του ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης και της συγκέντρωσης, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα εκτίμησης της 'EC_x' δηλ. οποιασδήποτε απαιτούμενης τιμής EC. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, δεν είναι αναγκαίος ο υπολογισμός του r για τα μεμονωμένα ψάρια (r_1) και η ανάλυση, αντ' αυτού, μπορεί να βασιστεί στη μέση ανά δεξαμενή τιμή του r (r_2). Η τελευταία αυτή μέθοδος προτιμάται. Είναι επίσης καταλληλότερη στην περίπτωση χρήσης πολύ μικρών ειδών.

Ο μέσος ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης δεξαμενής (r_2) θα πρέπει να παρίσταται γραφικά συναρτήσει της συγκεντρώσεως, για να ελέγχεται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης.

Για την έκφραση της σχέσης μεταξύ r_2 και συγκεντρώσεως, θα πρέπει να επιλέγεται ένα κατάλληλο μοντέλο, η επιλογή του οποίου πρέπει να στηρίζεται σε κατάλληλη αιτιολόγηση.

Εάν οι αριθμοί των ψαριών που επέζησαν σε κάθε δεξαμενή είναι άνισοι, τότε η διεργασία της διαμόρφωσης του μοντέλου, απλό ή μη γραμμικό, θα πρέπει να σταθμίζεται έτσι ώστε να λαμβάνονται υπόψη τα άνισα μεγέθη των ομάδων.

Η μέθοδος της διαμόρφωσης του μοντέλου πρέπει να καθιστά δυνατή την επίτευξη εκτίμησης της, π.χ., EC₂₀ και της διασποράς της (τυπικό σφάλμα ή εύρος εμπιστοσύνης). Το γράφημα του διαμορφωμένου μοντέλου θα πρέπει να παρουσιάζεται σε σχέση με τα δεδομένα έτσι ώστε να μπορεί να αποδειχθεί η καταλληλότητα της διαμόρφωσης του μοντέλου (8)(18)(19)(20).

2.1.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό της LOEC

Εάν η δοκιμή περιέλαβε δοκιμές επανάληψης σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης, ο υπολογισμός της LOEC μπορεί να βασιστεί σε ανάλυση μεταβλητότητας (ANOVA) του μέσου ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης δεξαμενής (βλ. σημείο 2.1), ακολουθούμενη από κατάλληλη μέθοδο (π.χ. δοκιμή Dunnett ή Williams (12)(13)(14)(21)) σύγκρισης του μέσου r για κάθε συγκέντρωση με το μέσο r για τους μάρτυρες για τον προσδιορισμό της κατώτατης συγκέντρωσης για την οποία η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική με στάθμη πιθανότητας 0.05. Εάν δεν πληρούνται οι υποθέσεις που απαιτούνται για παραμετρικές μεθόδους – μη κανονική κατανομή (π.χ. δοκιμή Shapiro-Wilk) ή ετερογενής μεταβλητότητα (variance) (δοκιμή Bartlett), θα πρέπει να εξεταστεί η μετατροπή των δεδομένων για την ομοιογενοποίηση των βαθμών μεταβλητότητας (variance) πριν από την εκτέλεση της ANOVA, ή η εκτέλεση σταθμισμένης ANOVA.

Εάν η δοκιμή δεν περιελάμβανε δεξαμενές επανάληψης σε κάθε συγκέντρωση, η προσφυγή σε ANOVA με βάση τις δεξαμενές είναι χωρίς νόημα ή αδύνατη. Στην περίπτωση αυτή, ένας αποδεκτός συμβιβασμός είναι να στηρίξουμε την ANOVA στον 'ψευδο' ιδιαίτερο βαθμό ανάπτυξης r_3 για μεμονωμένα ψάρια.

Ο μέσος r_3 για κάθε συγκέντρωση δοκιμής μπορεί στη συνέχεια να συγκριθεί με τον μέσο r_3 για τους μάρτυρες. Κατόπιν η LOEC μπορεί να προσδιοριστεί όπως προηγούμεως. Πρέπει να αναγνωριστεί ότι η μέθοδος αυτή δεν προσφέρει καμμία ανοχή, ούτε προστασία, για περίπτωση μεταβλητότητας μεταξύ δεξαμενών, πέραν εκείνης που προβλέπεται για περιπτώσεις μεταβλητότητας μεταξύ επιμέρους ψαριών. Εντούτοις, η εμπειρία έχει δείξει (8) ότι η μεταξύ δεξαμενών μεταβλητότητα είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με τη μεταβλητότητα εντός δεξαμενής (δηλ. μεταξύ ψαριών). Εάν δεν περιλαμβάνονται μεμονωμένα ψάρια στην ανάλυση, πρέπει να παρέχεται μέθοδος μεμονωμένου προσδιορισμού και αιτιολόγηση για τη χρήση του.

2.2 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με ιδιαίτερη προσοχή όταν οι μετρούμενες τοξικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου ή, στις ημιστατικές δοκιμές, όταν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας μειώνεται στο διάστημα που μεσολαβεί από την παρασκευή του διαλύματος μέχρι πριν από την ανανέωση.

2.3 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

2.3.1 Ουσία δοκιμής:

- φυσική μορφή και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,
- στοιχεία χημικής αναγνώρισης, συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή ουσίας, όταν χρειάζεται.

2.3.2 Είδος υπό δοκιμή:

- επιστημονική ονομασία, πιθανόν
- ποικιλία, μέγεθος, προμηθευτής, κάθε προηγούμενη αγωγή, κλπ.

2.3.3 Συνθήκες δοκιμής:

- χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (π.χ. ημιστατική/ανανέωση, συνεχής ροή, φόρτος, πυκνότητα πληθυσμού, κλπ),
- σχέδιο δοκιμής (π.χ. αριθμός δοχείων δοκιμής, συγκεντρώσεις δοκιμής και επαναλήψεις, αριθμός ψαριών ανά δοχείο),
- μέθοδος παρασκευής αρχικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (πρέπει να δίδεται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του, όταν χρησιμοποιείται),
- οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, ο μέσος όρος των μετρηθεισών τιμών και οι τυπικές τους αποκλίσεις στα δοχεία δοκιμής και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν, καθώς και αποδεικτικά στοιχεία ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας σε αληθές διάλυμα,
- τα χαρακτηριστικά του νερού αραιώσεως: pH, σκληρότητα, αλκαλικότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (αν ανιχνεύεται), συνολικός οργανικός άνθρακας, αιωρούμενα στερεά, αλατότητα του μέσου δοκιμής (αν μετριέται) και κάθε άλλη πραγματοποιηθείσα μέτρηση,
- η ποιότητα μέσα στα δοχεία δοκιμής: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,
- λεπτομερής ενημέρωση για τη διατροφή, (π.χ. τύπος τροφής(ών), πηγή, ποσότητα και συχνότητα).

2.3.4 Αποτελέσματα:

- στοιχεία ότι οι μάρτυρες πληρούσαν το κριτήριο εγκυρότητας ως προς την επιβίωση, καθώς και στοιχεία για τις θνησιμότητες που εμφανίστηκαν σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής,
- χρησιμοποιηθείσες στατιστικές αναλυτικές τεχνικές, στατιστικά βασιζόμενα σε επαναλήψεις ή σε ψάρια, επεξεργασία των δεδομένων και αιτιολόγηση των χρησιμοποιηθεισών τεχνικών,
- στοιχεία με μορφή πινάκων για τα ατομικά και τα μέσα βάρη των ψαριών κατά τις ημέρες 0, 14 (εφόσον έγινε μέτρηση) και 28 και τις τιμές του μέσου ανά δεξάμενη ή ψευδο ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης (αναλόγως) για την περίοδο 0-28 ή, ενδεχομένως, 0-14 και 14-28,
- αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης (δηλ. ανάλυση με αναγωγή ή ANOVA) κατά προτίμηση σε μορφή πίνακα και γραφική μορφή και η LOEC ($p = 0.05$) καθώς και η NOEC ή η EC_x μαζί, όταν είναι δυνατόν, με τα τυπικά σφάλματα, αναλόγως,
- στοιχεία για οποιαδήποτε ασυνήθη αντίδραση των ψαριών και κάθε ορατή επίδραση που προκλήθηκε από την υπό δοκιμή ουσία.

3.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, **14**, pp 1855-1870.
- (4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Høfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, **21**, pp 157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (6) Holcombe , G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* **28**, pp 287-297.
- (7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecological Research Series EPA-600/3-91-063*. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.
- (8) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891*, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328-338.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.
- (10) Cox D.R. (1958). *Planning of experiments*. Wiley Edt.
- (11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.
- (12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **50**, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, **20**, pp 482-491.
- (14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* **27**, pp 103-117.
- (15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* **120**, 123-133.

- (16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, 33-41.
- (17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.
- (18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.
- (19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.
- (20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.
- (21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, pp 510-531.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΛΗΛΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Είδος	Συνιστώμενη περιοχή θερμοκρασιών δοκιμής (°C)	Φωτοπερίοδος (ώρες)	Συνιστώμενη περιοχή αρχικού βάρους ψαριών (g)	Απαιτούμενη ακρίβεια μέτρησης	Πληθυσμιακός φόρτος (g/l)	Ποκνότητα πληθυσμού (ανά λίτρο)	Τροφή	Διάρκεια δοκιμής (ημέρες)
Συνιστώμενο είδος:								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ιριδίζουσα πέστροφα	12.5 – 16.0	12 – 16	1 – 5	στα πλησιέστερα 100 mg	1.2 – 2.0	4	Ξηρά σολομονοειδή τυχθύδια	≥ 28
Άλλα καλώς τεκμηριωμένα είδη:								
<i>Danio rerio</i> ζεβρόψαρα	21 – 25	12 – 16	0.050 – 0.100	στο πλησιέστερο 1 mg	0.2 – 1.0	5 – 10	Ζώσα τροφή (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> ρυζόψαρα (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0.050 – 0.100	στο πλησιέστερο 1 mg	0.2 – 1.0	5 – 20	Ζώσα τροφή (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥ 28

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΜΕΡΙΚΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΔΡΑΙΩΣΕΩΣ

ΟΥΣΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
Διαμερισμένη ύλη	< 20 mg/l
Συνολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιοντισμένη αμμωνία	< 1 µg/l
Υπολειμματικό χλώριο	< 10 µg/l
Σύνολο οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	< 50 ng/l
Σύνολο οργανοχλωριούχων γ.φ. μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Συνολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

ΔΟΓΑΡΙΘΜΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΓΙΑ ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ (9)

Στήλη (Αριθμός συγκεντρώσεων μεταξύ 100 και 10, ή μεταξύ 10 και 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3.2	10	18	25	32	37	42
1.0	4.6	10	16	22	27	32
	2.2	5.6	10	15	19	24
	1.0	3.2	6.3	10	14	18
		1.8	4.0	6.8	10	13
		1.0	2.5	4.6	7.2	10
			1.6	3.2	5.2	7.5
			1.0	2.2	3.7	5.6
				1.5	2.7	4.2
				1.0	1.9	3.2
					1.4	2.4
					1.0	1.8
						1.3
						1.0

* Από μια στήλη μπορεί να επιλεγεί μια σειρά πέντε (ή περισσότερων) διαδοχικών συγκεντρώσεων. Ενδιάμεσα σημεία μεταξύ συγκεντρώσεων στη στήλη (x) βρίσκονται στη στήλη (2x + 1). Οι καταγραφόμενες τιμές μπορεί να αντιπροσωπεύουν συγκεντρώσεις εκφραζόμενες ως % κατ' όγκο ή κατά βάρος (mg/l ή µg/l). Οι τιμές μπορούν να πολλαπλασιαστούν ή να διαιρεθούν με οποιαδήποτε δύναμη του 10, αναλόγως. Η στήλη 1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί αν υφίσταται σημαντική αβεβαιότητα ως προς τα επίπεδα τοξικότητας.

Γ.15. ΨΑΡΙΑ, ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΕΚΙΘΟΦΟΡΑ ΙΧΘΥΔΙΑ (SAC-FRY STAGES)

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης βραχυπρόθεσμης τοξικότητας αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 212 (1998) του ΟΟΣΑ.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος μελέτης της βραχυπρόθεσμης τοξικότητας στα έμβρυα ψαριών και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry stages) αποτελεί βραχυπρόθεσμη δοκιμασία στην οποία εκτίθενται τα ψάρια από το στάδιο του αυγού που μόλις έχει γονιμοποιηθεί έως το τέλος του σταδίου των λεκιθοφόρων ιχθυδίων (sac-fry stage). Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας δεν παρέχεται τροφή στα έμβρυα και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry), επομένως η δοκιμασία πρέπει να ολοκληρώνεται όσο τα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry) τρέφονται ακόμη από τον λεκιθικό σάκο.

Σκοπός της δοκιμασίας είναι να οριστούν οι θανατηφόρες και, σε περιορισμένο βαθμό, οι σχεδόν θανατηφόρες επιπτώσεις των χημικών ουσιών στα συγκεκριμένα στάδια εξέλιξης και στα συγκεκριμένα είδη. Από τη δοκιμασία μπορούν να ληφθούν χρήσιμες πληροφορίες καθώς α) μπορεί να αποτελέσει σύνδεσμο μεταξύ θανατηφόρων και σχεδόν θανατηφόρων δοκιμασιών β) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δοκιμασία επιλογής ενόψει είτε μιας (πλήρους) δοκιμασίας αρχικών σταδίων ζωής είτε μιας δοκιμασίας χρόνιας τοξικότητας και γ) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή δοκιμασίας σε είδη όπου οι τεχνικές εκτροφής δεν είναι τόσο προηγμένες ώστε να καλύπτουν την περίοδο μετάβασης από την ενδογενή στην εξωγενή διατροφή.

Δεν πρέπει να λησμονείται το γεγονός ότι μόνο οι δοκιμασίες που περιλαμβάνουν όλα τα στάδια του κύκλου ζωής του ψαριού είναι σε θέση να παρέχουν ακριβή εκτίμηση της χρόνιας τοξικότητας των χημικών ουσιών στα ψάρια και ότι κάθε μειωμένης διάρκειας έκθεση όσον αφορά τα στάδια ζωής μπορεί να μειώσει την ευαισθησία και επομένως να οδηγήσει σε υποτίμηση της χρόνιας τοξικότητας. Επομένως αναμένεται ότι η δοκιμασία εμβρύου και λεκιθοφόρου ιχθυδίου (sac-fry) θα είναι λιγότερο ευαίσθητη από την πλήρη δοκιμασία αρχικών σταδίων ζωής, ιδίως όσον αφορά τις εξαιρετικά λιπόφιλες ουσίες ($\log P_{ow} > 4$) και τις χημικές ουσίες ειδικής τοξικής δράσης. Για τις χημικές ουσίες μη ειδικής ναρκωτικής δράσης, ωστόσο, μπορεί να αναμένονται μικρότερες διαφορές ευαισθησίας μεταξύ των δύο δοκιμών (1).

Πριν τη δημοσίευση της παρούσας δοκιμασίας, σχεδόν όλα τα πειράματα στα έμβρυα και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac fry) πραγματοποιούνταν με τους ιχθύς γλυκών υδάτων *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae - κοινή ονομασία ζεβρόψαρο). Για το λόγο αυτό, στο παράρτημα Ι δίνονται λεπτομερείς οδηγίες για τη διεξαγωγή των δοκιμών στο εν λόγω είδος. Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει τη χρήση άλλων ειδών με τα οποία έχουν ήδη πραγματοποιηθεί πειράματα (πίνακας 1).

1.2

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης: (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ότι μια ουσία έχει επίδραση στατιστικώς σημαντική ($p < 0,05$), συγκριτικά με τους μάρτυρες. Εντούτοις, όλες οι συγκεντρώσεις οι μεγαλύτερες από τη LOEC πρέπει να ασκούν βλαβερή επίδραση ισοδύναμη ή μεγαλύτερη από την παρατηρούμενη με τη LOEC.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): είναι η συγκέντρωση η αμέσως χαμηλότερη της LOEC.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Τα έμβρυα και λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry) εκτίθενται σε μια σειρά υδατικών διαλυμάτων της δοκιμαστικής ουσίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το πρωτόκολλο επιτρέπει επιλογή μεταξύ μιας ημιστατικής διαδικασίας και μιας διαδικασίας συνεχούς ροής, ανάλογα με τη φύση της δοκιμαστικής ουσίας. Η δοκιμασία ξεκινάει με την τοποθέτηση γονιμοποιημένων αυγών στους δοκιμαστικούς θαλάμους και τελειώνει αμέσως πριν απορροφηθεί πλήρως ο λεκιθικός σάκος οποιασδήποτε προνύμφης (larvae) σε οποιονδήποτε από τους δοκιμαστικούς θαλάμους ή πριν σημειωθούν θάνατοι από αστία στους μάρτυρες. Οι θανατηφόρες και σχεδόν θανατηφόρες επιπτώσεις αξιολογούνται και συγκρίνονται με τις τιμές των μαρτύρων για να καθοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης και επομένως η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης. Εναλλακτικά, μπορούν να αναλυθούν με βάση ένα αναγωγικό μοντέλο για να υπολογιστεί κατ'εκτίμηση η συγκέντρωση που προκαλεί ένα δεδομένο ποσοστό επίδρασης (π.χ. LC/EC_x, όπου x είναι καθορισμένη % επίπτωση).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Πρέπει να είναι γνωστά τα αποτελέσματα μιας μελέτης οξείας τοξικότητας (βλ. μέθοδο Γ.1) που πραγματοποιήθηκε κατά προτίμηση στα ίδια είδη με αυτά που έχουν επιλεγεί για την παρούσα δοκιμασία. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αποδειχτούν χρήσιμα για τη σωστή επιλογή μιας σειράς συγκεντρώσεων για τις δοκιμασίες αρχικών σταδίων ζωής. Η υδατοδιαλυτότητα (περιλαμβανόμενης της διαλυτότητας στο νερό της δοκιμασίας) και η τάση ατμών της δοκιμαστικής ουσίας πρέπει να είναι γνωστά. Πρέπει επίσης να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ουσίας στα διαλύματα, της οποίας η ακρίβεια και το όρια ανίχνευσης να είναι γνωστά και δημοσιευμένα.

Πληροφορίες σχετικές με την ουσία οι οποίες να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών της δοκιμασίας είναι ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η σταθερότητα στο φως, η σταθερότητα στις συνθήκες της δοκιμασίας, οι συντελεστές pK_a, P_{ow} και τα αποτελέσματα μιας δοκιμασίας μελέτης της ευχέρειας βιοαποικοδόμησης (βλ. μέθοδο Γ.4).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμασίας είναι οι εξής:

- (3) η συνολική επιβίωση των γονιμοποιημένων αυγών στους μάρτυρες και, κατά περίπτωση, στα δοχεία που περιέχουν μόνο διαλύτη, πρέπει να είναι ανώτερη ή ίση με τις τιμές που καθορίζονται στα παραρτήματα 2 και 3.
- (4) η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου πρέπει να κυμαίνεται από 60 έως 100 % της τιμής κορεσμού με αέρα (air saturation value -ASV) σε όλη τη δοκιμασία.
- (5) η θερμοκρασία του ύδατος δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από $\pm 1,5$ °C μεταξύ δοκιμαστικών θαλάμων και μεταξύ διαδοχικών ημερών σε οποιαδήποτε στιγμή της δοκιμασίας και πρέπει να βρίσκεται εντός των ορίων θερμοκρασίας που έχουν προσδιοριστεί για κάθε είδος ψαριού (παραρτήματα 2 και 3).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Δοκιμαστικοί θάλαμοι

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε δοχεία από γυαλί ή άλλο χημικά αδρανές υλικό. Οι διαστάσεις των δοχείων πρέπει να είναι αρκετά μεγάλες ώστε να ανταποκρίνονται στο ρυθμό πλήρωσης (βλέπε 1.7.1.2). Συνιστάται να τοποθετούνται οι δοκιμαστικοί θάλαμοι με τυχαίο τρόπο στο χώρο εκτέλεσης των δοκιμών. Εάν υπάρχουν στο εργαστήριο συστηματικές επιδράσεις που μπορούν να ελεγχθούν με ομαδοποίηση των δοκιμαστικών θαλάμων, τότε είναι προτιμότερη μια σχετικά τυχαία ομαδοποίηση των θαλάμων όπου κάθε ομάδα περιλαμβάνει καθεμιά από τις αγωγές, παρά μια τελείως τυχαία κατανομή. Όταν ο σχεδιασμός του πειράματος προβλέπει ομαδοποίηση, το δεδομένο αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την επακόλουθη ανάλυση των δεδομένων. Οι δοκιμαστικοί θάλαμοι προστατεύονται από ανεπιθύμητες οχλήσεις.

Επιλογή είδους ψαριού.

Τα διάφορα είδη ψαριών που συνιστώνται για τη δοκιμασία περιλαμβάνονται στον πίνακα 1Α. Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει τη χρήση άλλων ειδών (παραδείγματα δίνονται στον πίνακα 1Β), αρκεί η διαδικασία να προσαρμοστεί με τρόπο ώστε να επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμασίας. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να αναφέρεται η αιτιολογία της επιλογής του είδους και της πειραματικής μεθόδου.

Συντήρηση των γεννητόρων

Λεπτομέρειες σχετικά με τη συντήρηση των γεννητόρων υπό ικανοποιητικές συνθήκες μπορούν να αναζητηθούν στο TG 210 του ΟΟΣΑ¹ και στις αναφορές (4), (5), και (6) της βιβλιογραφίας.

Προετοιμασία των εμβρύων και των προνυμφών (larvae).

Στο εσωτερικό του βασικού δοχείου, τα έμβρυα και οι προνύμφες (larvae) μπορούν να τοποθετηθούν σε μικρότερα δοχεία με πλευρές ή απολήξεις από πλέγμα ώστε να επιτρέπεται η ροή του δοκιμαστικού διαλύματος μέσω του δοχείου. Για να μη είναι τυρβώδης η ροή, τα μικρά δοχεία αναρτώνται από βραχίονα ο οποίος τα ανεβοκατεβάζει, με τους οργανισμούς όμως σταθερά μέσα στο νερό· μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σύστημα εκροής με σιφόνιο. Τα γονιμοποιημένα αβγά σολωμονοειδών μπορούν να τοποθετηθούν σε σχάρες ή σε πλέγματα με ανοίγματα αρκετά μεγάλα ώστε, μετά την εκκόλαψη, οι προνύμφες να μπορούν να βγουν. Για την απομάκρυνση των εμβρύων και των προνυμφών (larvae) στις ημιστατικές δοκιμασίες με πλήρη ημερήσια ανανέωση του νερού συνιστάται να χρησιμοποιούνται σιφόνια παστέρ.

Τα δοχεία, οι σχάρες και τα πλέγματα που χρησιμοποιούνται για τη συγκράτηση των αβγών εντός του βασικού δοχείου πρέπει να αφαιρούνται μετά την εκκόλαψη των προνυμφών¹ (larvae), εκτός από τα πλέγματα που χρειάζονται για να μη φύγουν τα ψάρια. Εάν οι προνύμφες (larvae) χρειαστεί να μεταφερθούν, δεν θα πρέπει να εκτεθούν στον αέρα και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν δίχτυα για την ελευθέρωση των ψαριών από τα δοχεία που περιέχουν τα αβγά (αντές οι προφυλάξεις δεν είναι απαραίτητες για λιγότερα ευαίσθητα είδη, όπως ο κυπρίνος). Η μεταφορά, η χρονική στιγμή της οποίας εξαρτάται από το είδος, δεν είναι πάντοτε απαραίτητη. Για την ημιστατική τεχνική, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κύπελλα ή αβαθή δοχεία και, εάν χρειάζεται, να εξοπλιστούν με δικτυωτό προπέτασμα ελαφρώς υπερυψωμένο ως προς τον πυθμένα. Εάν ο όγκος των δοχείων ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις φόρτωσης (βλέπε 1.7.1.2), τότε μπορεί να μην χρειαστεί η μεταφορά των εμβρύων ή των προνυμφών (larvae).

Νερό

Κάθε νερό που διαθέτει τα χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραιώσης τα οποία απαριθμούνται στο παράρτημα 4 και στο οποίο τα δοκιμαζόμενα είδη σημειώνουν επιβίωση μαρτύρων τουλάχιστον ίση με την περιγραφόμενη στα παραρτήματα 2 και 3, είναι κατάλληλο για τη δοκιμασία. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Το pH πρέπει να κυμαίνεται κατά $\pm 0,5$. Για να είναι βέβαιο ότι το νερό της αραιώσης δεν θα επηρεάσει κατά τρόπο ανεπιθύμητο το αποτέλεσμα της δοκιμασίας (π.χ., δημιουργώντας σύμπλοκα με την υπό δοκιμή ουσία) και τη συμπεριφορά των γεννητόρων, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν ένα νερό είναι γνωστό ότι είναι σχετικά σταθερό από πλευράς ποιότητας θα πρέπει, π.χ., κάθε τρεις μήνες, να γίνεται μέτρηση βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd και Ni), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca, Mg, Na, K, Cl και SO₄), φυτοφαρμάκων (π.χ. συνολικά οργανοφωσφορικά και συνολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα), συνολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών. Εάν η ποιότητα του νερού έχει αποδειχθεί ότι είναι σταθερή για ένα τουλάχιστον χρόνο, η συχνότητα των προσδιορισμών μπορεί να περιοριστεί και τα διαστήματα να αυξηθούν (π.χ. κάθε έξι μήνες).

¹ OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test".

Διαλύματα δοκιμής.

Τα διαλύματα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραιώση αρχικού πυκνού διαλύματος.

Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανάδευση της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό αραιώσης με μηχανικά μέσα (π.χ. με μηχανική ανάδευση ή με υπερήχους). Για να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση του αρχικού πυκνού διαλύματος είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες κορεσμού (στήλες διαλυτότητας). Πρέπει να αποφεύγεται, κατά το δυνατόν, η χρησιμοποίηση διαλυτών ή προσθέτων διασποράς (παραγόντων διαλυτοποίησης) εντούτοις, αυτές οι ουσίες είναι μερικές φορές απαραίτητες για την παρασκευή αρχικού πυκνού διαλύματος κατάλληλης συγκέντρωσης. Παραδείγματα κατάλληλων διαλυτών είναι η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη, ενώ κατάλληλα πρόσθετα διασποράς είναι το Cremophor RH40, το Tween 80, η μεθυλοκυτταρίνη 0,01% και το HCO-40. Όταν χρησιμοποιούνται παράγοντες που βιοαποικοδομούνται εύκολα (π.χ. ακετόνη) ή/και παράγοντες υψηλής πτητικότητας, η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται με προσοχή γιατί μπορεί να προκαλέσουν την ανάπτυξη βακτηρίων στις δοκιμασίες συνεχούς ροής. Όταν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης, αυτός δεν πρέπει να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην επιβίωση ούτε ορατές δυσμενείς επιπτώσεις στα αρχικά στάδια της ζωής οπότε πρέπει να εκτελείται δοκιμασία ελέγχου με διαλύτη μόνο. Θα πρέπει πάντως να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια ώστε να αποφεύγεται η χρήση τέτοιων υλικών.

Για την ημιστατική τεχνική, είναι δυνατόν να ακολουθηθούν δύο διαφορετικές διαδικασίες ανανέωσης : είτε, α) ετοιμάζονται νέα δοκιμαστικά διαλύματα σε καθαρά δοχεία και τα αβγά και οι προνύμφες (larvae) που έχουν επιβιώσει μεταφέρονται με ήπιο τρόπο στα νέα δοχεία εντός μικρού όγκου του παλαιού διαλύματος, χωρίς να εκτίθενται στον αέρα ή β) οι δοκιμαζόμενοι οργανισμοί διατηρούνται στα δοχεία ενώ αντικαθίσταται μέρος μόνο (τουλάχιστον τρία τέταρτα) του νερού. Η συχνότητα ανανέωσης του μέσου εξαρτάται από τη σταθερότητα της δοκιμαστικής ουσίας, συνιστάται πάντως καθημερινή ανανέωση του νερού. Εάν από προκαταρκτικές δοκιμασίες μελέτης της σταθερότητας (βλ. 1.4) είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας δεν είναι σταθερή (βρίσκεται δηλαδή εκτός των ορίων 80 – 120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης ή κάτω από το 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης), σε όλη τη διάρκεια της ανανέωσης, πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο να χρησιμοποιηθεί δοκιμασία συνεχούς ροής. Σε κάθε περίπτωση, πρέπει να καταβληθεί προσπάθεια να αποφευχθεί το στρες στις προνύμφες κατά την διαδικασία ανανέωσης του νερού.

Στις δοκιμασίες συνεχούς ροής, για την προσαγωγή των διαλυμάτων στους δοκιμαστικούς θαλάμους απαιτείται σύστημα το οποίο να παρέχει συνεχώς και να αραιώνει ένα αρχικό διάλυμα της δοκιμαστικής ουσίας (π.χ. αντίλα μετρήσεως, αναλογικός αραιωτής, σύστημα κορεσμού). Ο ρυθμός ροής των αρχικών διαλυμάτων και του νερού αραιώσης ελέγχεται κατά διαστήματα, κατά προτίμηση καθημερινά, και δεν διαφέρει περισσότερο από 10 % καθ'όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας. Θεωρείται κατάλληλη μια ταχύτητα ροής ισοδύναμη με τον όγκο τουλάχιστον πέντε δοκιμαστικών θαλάμων ανά 24 ώρες (2).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία περιέχονται χρήσιμες πληροφορίες για την εκτέλεση των δοκιμασιών τοξικότητας στα έμβρυα ιχθύων και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry). Σχετικές παραπομπές υπάρχουν στις αναφορές (7)(8)(9) στη βιβλιογραφία του παρόντος.

Συνθήκες έκθεσης.

Διάρκεια

Η δοκιμασία αρχίζει κατά προτίμηση εντός 30 λεπτών αφότου γονιμοποιηθούν τα αβγά. Τα έμβρυα ιχθύων εμβυθίζονται στο δοκιμαστικό διάλυμα πριν αρχίσει το στάδιο της κυτταρικής διαίρεσης των βλαστοδίσκων ή αμέσως μετά, και πάντως προτού αρχίσει το στάδιο του γαστριδίου. Εάν τα αβγά προέρχονται από εξωτερικό προμηθευτή, είναι πιθανό να μην είναι δυνατό να ξεκινήσει η δοκιμασία αμέσως μετά τη γονιμοποίηση. Δεδομένου ότι η ευαισθησία της δοκιμασίας μπορεί να επηρεαστεί αισθητά από την καθυστέρηση έναρξης, η δοκιμασία πρέπει να ξεκινήσει εντός 8ώρου αφότου γίνει η γονιμοποίηση. Καθώς οι προνύμφες (larvae) δεν λαμβάνουν τροφή κατά την περίοδο έκθεσης, η δοκιμασία πρέπει να τελειώνει αμέσως πριν απορροφηθεί πλήρως ο λεκιθικός σάκος οποιασδήποτε προνύμφης (larvae) σε οποιοδήποτε από τους δοκιμαστικούς θαλάμους ή πριν σημειωθούν θάνατοι από αστία στους μάρτυρες. Η διάρκεια εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο είδος. Στα παραρτήματα 2 και 3 προτείνονται χρόνοι για τη διάρκεια.

Φορτίο

Ο αριθμός γονιμοποιημένων αβγών στην αρχή της δοκιμασίας πρέπει να είναι στατιστικώς επαρκής. Τα αβγά κατανέμονται στις διάφορες ομάδες αγωγής με τυχαίο τρόπο, και χρησιμοποιούνται ανά συγκέντρωση τουλάχιστον 30 γονιμοποιημένα αβγά ισοκατανεμημένα (όσο είναι δυνατόν δεδομένου ότι για ορισμένα είδη είναι δύσκολο να ληφθούν ίσες παρτίδες) σε 3 τουλάχιστον όμοιους δοκιμαστικούς θαλάμους. Ο ρυθμός πλήρωσης (βιομάζα ανά όγκο δοκιμαστικού διαλύματος) πρέπει να είναι επαρκώς χαμηλός ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα (ASV) χωρίς αερισμό. Για τις δοκιμασίες συνεχούς ροής συνιστάται ο ρυθμός πλήρωσης να μην υπερβαίνει το 0.5 g/l ανά 24ωρο και να μην υπερβαίνει τα 5 g/l διαλύματος οποιαδήποτε στιγμή (2).

Φως και θερμοκρασία

Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού της δοκιμής θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις ανάγκες του χρησιμοποιούμενου είδους ψαριών (παραρτήματα 2 και 3). Για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας, ενδείκνυται ίσως η χρήση ενός επιπλέον δοκιμαστικού δοχείου.

Συγκεντρώσεις

Κανονικά απαιτούνται 5 συγκεντρώσεις της δοκιμαστικής ουσίας οι οποίες να απέχουν μεταξύ τους κατά ένα σταθερό παράγοντα που δεν υπερβαίνει το 3,2. Η καμπύλη που συνδέει την LC₅₀ με την περίοδο έκθεσης στη μελέτη οξείας τοξικότητας πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την επιλογή της σειράς συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία. Υπό ορισμένες συνθήκες, π.χ. στις οριακές δοκιμασίες, μπορεί να ενδείκνυται η χρήση λιγότερων από πέντε συγκεντρώσεων που θα απέχουν μάλιστα και λιγότερο μεταξύ τους. Εάν η δοκιμασία γίνει σε λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, θα πρέπει να δοθούν εξηγήσεις. Δεν χρειάζεται να δοκιμάζονται συγκεντρώσεις της ουσίας ανώτερες από την LC₅₀ 96 ωρών ή από 100 mg/l, όποια είναι χαμηλότερη. Οι ουσίες δεν πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμασία σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από το όριο διαλυτότητά τους στο νερό της δοκιμασίας.

Όταν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης για την παρασκευή των διαλυμάτων (βλ. 1.6.6), η τελική του συγκέντρωση στα δοχεία δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/l, η ίδια σε όλα τα δοχεία.

Μάρτυρες

Επιπλέον της κανονικής σειράς δοκιμασιών, πρέπει να γίνουν δοκιμασίες με σειρά μαρτύρων του νερού της δοκιμασίας (σε ικανοποιητικό αριθμό επαναλήψεων) και, εφόσον έχει νόημα, με σειρά μαρτύρων που περιέχουν τον παράγοντα διαλυτοποίησης (σε ικανοποιητικό αριθμό επαναλήψεων).

Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, οι συγκεντρώσεις της δοκιμαστικής ουσίας προσδιορίζονται σε τακτά διαστήματα.

Στις ημιστατικές δοκιμασίες όπου η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας αναμένεται να παραμένει εντός του $\pm 20\%$ της ονομαστικής (δηλαδή εντός των ορίων 80 – 120 %· βλ. 1.4 και 1.6.6), συνιστάται να αναλύονται οι ελάχιστες και οι μέγιστες συγκεντρώσεις δοκιμής τουλάχιστον αμέσως μετά την παρασκευή τους και αμέσως πριν την ανανέωση του νερού και τουλάχιστον τρεις φορές σε τακτά διαστήματα κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (πρέπει δηλαδή να αναλύεται δείγμα του ίδιου διαλύματος αμέσως μετά την παρασκευή και αμέσως πριν την ανανέωσή του).

Όταν προβλέπεται ότι η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας δεν θα παραμείνει εντός του $\pm 20\%$ της ονομαστικής τιμής (με βάση τα στοιχεία για τη σταθερότητα της ουσίας), είναι απαραίτητο να αναλυθούν όλες οι συγκεντρώσεις, αμέσως μετά την παρασκευή και κατά την ανανέωση, με εφαρμογή όμως του ίδιου προγράμματος (δηλαδή τουλάχιστον τρεις φορές σε τακτά διαστήματα κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας). Σε όλες τις περιπτώσεις, ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της δοκιμαστικής ουσίας πριν την ανανέωση χρειάζεται να γίνεται σε ένα μόνο από τα όμοια δοχεία για κάθε συγκέντρωση. Το χρονικό διάστημα μεταξύ προσδιορισμών δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 7 ημέρες. Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Εάν μπορεί να αποδειχτεί ότι η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας καθ'όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας διατηρήθηκε συνεχώς εντός του $\pm 20\%$ της ονομαστικής ή της αρχικής μετρηθείσας συγκέντρωσης, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να βασιστούν στις ονομαστικές ή τις αρχικώς μετρηθείσες τιμές.

Σε δοκιμασία συνεχούς ροής, ενδείκνυται καθεστώς δειγματοληψίας ανάλογο με το περιγραφόμενο για ημιστατικές δοκιμασίες (στην περίπτωση όμως αυτή δεν ισχύουν οι μετρήσεις "παλαιών" διαλυμάτων). Εντούτοις, εάν η διάρκεια της δοκιμασίας υπερβαίνει τις 7 ημέρες, καλό θα ήταν να αυξηθεί ο αριθμός των δειγματοληψιών στη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας (π.χ. τρεις σειρές μετρήσεων) ώστε να είναι βέβαιο ότι οι συγκεντρώσεις παραμένουν σταθερές.

Ίσως χρειάζεται να φυγοκεντρηθούν ή να διηθηθούν τα δείγματα (π.χ. με μέγεθος πόρου 0,45 μm). Ωστόσο, επειδή ούτε η διήθηση ούτε η φυγοκέντρωση φαίνεται να διαχωρίζουν πάντοτε το μη βιοδιαθέσιμο κλάσμα της δοκιμαστικής ουσίας από εκείνο που είναι βιοδιαθέσιμο, τα δείγματα μπορούν να μην υποβάλλονται σε αυτές τις κατεργασίες.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, σε όλα τα δοχεία θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις της συγκέντρωσης του διαλελυμένου οξυγόνου, του pH και της θερμοκρασίας. Στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με την ανώτερη συγκέντρωση θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις της ολικής σκληρότητας και αλατότητας (εάν χρειάζεται). Το διαλελυμένο οξυγόνο και η αλατότητα (εφόσον χρειάζεται) θα πρέπει να μετρούνται τουλάχιστον τρεις φορές (στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της δοκιμασίας). Στις ημιστατικές δοκιμασίες, συνιστάται να εκτελούνται συχνότερες μετρήσεις του διαλελυμένου οξυγόνου, κατά προτίμηση πριν και μετά από κάθε ανανέωση του νερού ή τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Το pH πρέπει να μετρείται στην αρχή και στο τέλος κάθε ανανέωσης του νερού στην ημιστατική δοκιμασία και τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα στις δοκιμασίες συνεχούς ροής. Η σκληρότητα πρέπει να μετρείται μία φορά σε κάθε δοκιμασία. Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετρείται ημερησίως και κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα τουλάχιστον δοχείο.

Παρατηρήσεις

Στάδιο εμβρυϊκής ανάπτυξης

Το εμβρυϊκό στάδιο (π.χ. στάδιο γαστριδίου) στο οποίο βρίσκεται το υλικό στην αρχική φάση έκθεσης στη δοκιμαστική ουσία πρέπει να επαληθεύεται όσο το δυνατόν ακριβέστερα. Η επαλήθευση μπορεί να γίνει σε αντιπροσωπευτικό δείγμα αβγών τα οποία έχουν διατηρηθεί και καθαριστεί καταλλήλως. Είναι επίσης δυνατό να χρησιμοποιηθούν περιγραφές και απεικονίσεις των εμβρυϊκών σταδίων από τη βιβλιογραφία (2)(5)(10)(11).

Εκκόλαση και επιβίωση

Η εκκόλαση και η επιβίωση πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα και να καταγράφονται τα αριθμητικά δεδομένα. Είναι ενδεχομένως σκόπιμο να γίνονται συχνότερες παρατηρήσεις στην αρχή της δοκιμασίας (π.χ. κάθε 30 λεπτά κατά τις πρώτες 3 ώρες), καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις, οι χρόνοι επιβίωσης μπορεί να είναι πιο χρήσιμοι από τον αριθμό των θανάτων (π.χ. όταν υπάρχουν οξείες τοξικές επιπτώσεις). Τα νεκρά έμβρυα και οι προνύμφες (larvae) πρέπει να απομακρύνονται αμέσως μόλις υποβληθούν σε παρατήρηση δεδομένου ότι αποσυντίθενται γρήγορα. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή όταν απομακρύνονται τα νεκρά στοιχεία ώστε να μην χτυπηθούν ή υποστούν φυσική ζημιά τα γειτονικά αβγά/προνύμφες (larvae) καθώς είναι εξαιρετικά εύθραυστα και ευαίσθητα. Τα κριτήρια θανάτου είναι διαφορετικά αναλόγως του σταδίου ζωής.

- (6) **για τα αβγά** : ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια, αισθητή μείωση διαφάνειας και αλλαγή χρώματος, λόγω πήξης ή/και καταβύθισης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα λευκή θαμπή όψη.
- (7) **για τα έμβρυα** : απουσία κίνησης του σώματος ή/και απουσία καρδιακού ρυθμού ή/και αποχρωματισμός και απώλεια διαφάνειας στα είδη των οποίων τα έμβρυα είναι κανονικά διαπερατά στο φως.
- (8) **για τις προνύμφες (larvae)** : ακινησία ή/και απώλεια αναπνευστικής κίνησης ή/και απουσία καρδιακού ρυθμού ή/και λευκό θαμπό χρώμα του κεντρικού νευρικού συστήματος ή/και έλλειψη αντίδρασης στα μηχανικά ερεθίσματα.

Αφύσικη όψη

Ο αριθμός προνυμφών (larvae) που εμφανίζουν αφύσικο σχήμα σώματος ή/και χρωματισμό κατά το στάδιο απορρόφησης του λεκιθικού σάκου θα πρέπει να καταγράφονται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα ανάλογα με τη διάρκεια της δοκιμασίας και το είδος της παρατηρούμενης ανωμαλίας. Πρέπει να σημειωθεί ότι ανώμαλα έμβρυα και προνύμφες (larvae) είναι φυσικό να εμφανίζονται και μπορεί να αντιπροσωπεύουν σημαντικό ποσοστό των μαρτύρων σε ορισμένα είδη. Τα ανώμαλα ζώα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοκιμαστικά δοχεία μόνο όταν πεθάνουν.

Αφύσικη συμπεριφορά

Οι ανωμαλίες, π.χ. υπεραερισμός, ασυντόνιστη κολύμβηση και ατυπική αταραξία πρέπει να καταγράφονται σε κατάλληλα διαστήματα αναλόγως της διάρκειας της δοκιμασίας. Αυτές οι επιπτώσεις, παρ'όλο που είναι δύσκολο να εκφραστούν ποσοτικά, μπορούν, όταν έχουν παρατηρηθεί, να βοηθήσουν στην ερμηνεία των δεδομένων θνησιμότητας π.χ. να παράσχουν πληροφορίες για τον τρόπο τοξικής δράσης της ουσίας.

Μήκος

Στο τέλος της δοκιμασίας συνιστάται η μέτρηση του μήκους κάθε ψαριού χωριστά· μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κανονικό μήκος, το μήκος έως τα πτερύγια ή το συνολικό μήκος. Εάν ωστόσο σημειωθεί αποσύνθεση του πτερυγίου της ουράς ή διάβρωση των πτερυγίων πρέπει να χρησιμοποιείται το κανονικό μήκος. Γενικά, όταν η δοκιμασία εκτελείται σωστά, ο συντελεστής απόκλισης του μήκους μεταξύ των επαναλήψεων των μαρτύρων πρέπει να είναι $\leq 20\%$.

Βάρος

Στο τέλος της δοκιμασίας μπορεί να μετρηθεί το βάρος κάθε ψαριού χωριστά· το ξηρό βάρος (24 ώρες σε 60 °C) προτιμάται από το υγρό βάρος (μετά από στέγνωμα). Γενικά, όταν η δοκιμασία εκτελείται σωστά, ο συντελεστής απόκλισης του βάρους μεταξύ των επαναλήψεων των μαρτύρων πρέπει να είναι $\leq 20\%$.

Αυτές οι παρατηρήσεις θα έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχουν διαθέσιμα για στατιστική ανάλυση τα εξής δεδομένα:

- (9) συνολική θνησιμότητα
- (10) αριθμός υγιών προνυμφών (larvae) στο τέλος της δοκιμασίας·
- (11) χρόνος μεταξύ έναρξης της εκκόλαψης και λήξης της εκκόλαψης (δηλ. εκκόλαψη κατά 90% σε κάθε επαναληπτική ομάδα)
- (12) αριθμός προνυμφών (larvae) που εκκολάπτονται κάθε μέρα·
- (13) μήκος (και βάρος) των επιζώντων ζώων στο τέλος της δοκιμασίας·
- (14) αριθμός παραμορφωμένων προνυμφών (larvae) ή που εμφανίζουν αφύσικη όψη·
- (15) αριθμός προνυμφών (larvae) που εμφανίζουν αφύσικη συμπεριφορά.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συνιστάται η συμμετοχή στατιστικολόγου στην εκτέλεση τόσο του σχεδιασμού όσο και της ανάλυσης της δοκιμασίας, επειδή η μέθοδος επιτρέπει σημαντικές διαφορές στον πειραματικό σχεδιασμό, π.χ. στον αριθμό των δοκιμαστικών θαλάμων, στον αριθμό των συγκεντρώσεων, στον αρχικό αριθμό γονιμοποιημένων αβγών και στις μετρούμενες παραμέτρους. Επειδή υπάρχουν πολλές επιλογές για τον σχεδιασμό της δοκιμασίας, δεν δίνονται εδώ ειδικές οδηγίες για τη στατιστική επεξεργασία.

Εάν πρέπει να υπολογιστούν οι τιμές LOEC/NOEC, θα είναι απαραίτητο να αναλυθούν οι διαφορές σε κάθε επαναληπτική ομάδα με ανάλυση διασποράς (ANOVA) ή πίνακα συσχετισμού. Για την εκτέλεση πολλαπλών συγκρίσεων μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφορετικών συγκεντρώσεων και των αποτελεσμάτων των μαρτύρων, ενδείκνυται ενδεχομένως η μέθοδος Dunnett (12)(13). Άλλα χρήσιμα παραδείγματα είναι επίσης διαθέσιμα, αναφορές (14), (15). Πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται ο βαθμός επίδρασης που μπορεί να εντοπιστεί μέσω ANOVA ή με άλλη διαδικασία (ήτοι η ισχύς της δοκιμασίας). Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι όλες οι παρατηρήσεις που αναφέρονται στο σημείο 1.7.5.6 κατάλληλες για στατιστική ανάλυση με ANOVA. Για παράδειγμα, η συνολική θνησιμότητα και ο αριθμός υγιών προνυμφών (larvae) στο τέλος της διαδικασίας θα μπορούσαν να αναλυθούν με μεθόδους probit.

Εάν πρέπει να υπολογιστούν οι τιμές LC/EC_x, πρέπει να προσαρμόζονται τα δεδομένα που έχουν επιλεγεί σε μία ή πολλές κατάλληλες καμπύλες, όπως η λογιστική καμπύλη, με στατιστική μέθοδο όπως των ελαχίστων τετραγώνων ή των μη γραμμικών ελαχίστων τετραγώνων. Η καμπύλη ή οι καμπύλες μπορούν να γίνουν παραμετρικές ώστε να είναι δυνατόν να προσδιοριστούν απευθείας η LC/EC_x και το τυπικό σφάλμα αυτής. Διευκολύνεται έτσι σε μεγάλο βαθμό ο υπολογισμός του ορίου εμπιστοσύνης της LC/EC_x. Καθορίζεται αμφίπλευρο επίπεδο εμπιστοσύνης 95 %, εκτός εάν υπάρχουν βάσιμοι λόγοι να καθοριστεί άλλο. Η διαδικασία προσαρμογής καλό είναι να παρέχει ένα μέσο ελέγχου της σημαντικότητας της έλλειψης προσαρμογής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί γραφική μέθοδος για την προσαρμογή των καμπυλών. Η αναγωγική ανάλυση είναι κατάλληλη για όλες τις παρατηρήσεις που αναφέρονται στο σημείο 1.7.5.6.

0 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες τοξικές συγκεντρώσεις των δοκιμαστικών διαλυμάτων βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων για συγκεντρώσεις πάνω από την υδατοδιαλυτότητα της ουσίας πρέπει επίσης να γίνεται με προσοχή.

2.3 ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.3.1 Δοκιμαστική ουσία

(16) φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες που αφορούν τη δοκιμασία.

(17) χημικά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων η καθαρότητα και αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της εξεταζόμενης ουσίας, όπου απαιτείται.

2.3.2 Είδος ψαριού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή.

(18) επιστημονική ονομασία, στέλεχος, αριθμός γεννητόρων (ήτοι πόσα θηλυκά χρησιμοποιήθηκαν για να ληφθεί ο απαιτούμενος αριθμός αβγών στη δοκιμασία), πηγή και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αβγών και επακόλουθος χειρισμός.

2.3.3 **Συνθήκες εκτέλεσης της δοκιμασίας**

- (19) χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμασίας (π.χ. ημιστατική ή συνεχούς ροής, χρονικό διάστημα από τη γονιμοποίηση ως την έναρξη της δοκιμασίας, ρυθμός πλήρωσης, κ.λπ.)·
- (20) φωτοπερίοδος·
- (21) σχεδιασμός της δοκιμασίας (π.χ. αριθμός δοκιμαστικών θαλάμων και αριθμός επαναλήψεων με την ίδια συγκέντρωση, αριθμός εμβρύων ανά επαναλαμβανόμενο δοχείο)·
- (22) μέθοδος παρασκευής των αρχικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (αναφέρονται, εφόσον χρησιμοποιούνται, ο παράγοντας διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του)·
- (23) οι ονομαστικές συγκεντρώσεις των δοκιμών, οι μετρηθείσες τιμές, οι μέσες τιμές των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοκιμαστικά δοχεία καθώς και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν και εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι διαλυτή στο νερό σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τις χρησιμοποιούμενες στη δοκιμασία, πρέπει να παρέχονται αποδεικτικά στοιχεία σύμφωνα με τα οποία οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας που είναι διαλυμένη·
- (24) χαρακτηριστικά του νερού διάλυσης : ήτοι pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετρείται), ολικός οργανικός άνθρακας, αιωρούμενα στερεά, αλατότητα του δοκιμαστικού μέσου (εφόσον μετρείται) και τυχόν άλλες μετρήσεις·
- (25) ποιότητα του νερού στα δοκιμαστικά δοχεία : pH, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου.

2.3.4 **Αποτελέσματα:**

- (26) αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικών μελετών σχετικά με τη σταθερότητα της δοκιμαστικής ουσίας·
- (27) στοιχεία ότι οι μάρτυρες πληρούν το πρότυπο αποδεκτής συνολικής επιβίωσης για το είδος ψαριού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή (παραρτήματα 2 και 3)·
- (28) στοιχεία για τη θνησιμότητα/επιβίωση στα στάδια του εμβρύου και της προνύμφης (larvae) και συνολική θνησιμότητα/επιβίωση·
- (29) ημέρες εκκόλαψης και αριθμός εκκολαφθέντων αβγών·
- (30) στοιχεία σχετικά με το μήκος (και το βάρος)·
- (31) συχνότητα εμφάνισης και περιγραφή μορφολογικών ανωμαλιών, εάν υπάρχουν·
- (32) συχνότητα εμφάνισης και περιγραφή επιπτώσεων στη συμπεριφορά, εάν υπάρχουν·
- (33) στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων·
- (34) για τις δοκιμασίες που αναλύονται με ANOVA, η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίπτωση (LOEC) σε $p=0.05$ και η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίπτωση (NOEC) για κάθε απάντηση που αξιολογείται καθώς και περιγραφή των στατιστικών διαδικασιών που χρησιμοποιήθηκαν και ενδεικτική αναφορά του μεγέθους των επιπτώσεων που μπορούν να ανιχνευθούν·
- (35) για τις δοκιμασίες που αναλύθηκαν με τεχνικές αναγωγής, ο λόγος LC/EC_x και τα διαστήματα εμπιστοσύνης καθώς και γραφική παράσταση του μοντέλου προσέγγισης που χρησιμοποιήθηκε για τους σχετικούς υπολογισμούς·
- (36) αιτιολόγηση κάθε παρέκκλισης από τη μέθοδο της δοκιμασίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, pp 60. June 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121-173.
- (6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. J. Aquatic Toxicology, 9, 129-145.
- (10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.
- (3) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
- (15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp 321-334.
- (3) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, pp 81.

- (4) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, **21**, 126-134.
- (5) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology - an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, **252**: 231-236.
- (6) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety **32**, 19-28.
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. **10**, 1189-1203.
- (23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- (25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, pp 1-58.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1Α: ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ ΠΟΥ ΣΥΝΙΣΤΩΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ

ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ
<i>Oncorhynchus mykiss</i> γραβανή (αμερικάνικη) πέστροφα (9)(16)
<i>Danio rerio</i> ζεβρόψαρο (7)(17)(18)
<i>Cyprinus caprio</i> κοινός κυπρίνος (σαζάνι) (8)(19)
<i>Oryzias latipes</i> γιαπωνέζικο ριζόψαρο / Medaka (20)(21)
<i>Pimephales promelas</i> χοντροκέφαλη τσίμα (8)(22)

ΠΙΝΑΚΑΣ 1Β: ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΛΛΩΝ ΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΥΠΑΡΧΕΙ ΕΠΑΡΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΑΙ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΧΟΥΝ ΕΠΙΣΗΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ

ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ	ΑΛΜΥΡΟΥ ΝΕΡΟΥ
<i>Carassius auratus</i> χρυσόψαρο (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside(23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> γαλαζόσπλαγνο λεστί (8)	<i>Clupea harengus</i> ρέγγα (24) (25)
	<i>Gadus Morhua</i> βακαλάος (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> πολύχρωμη τσίμα (23)(24)(25)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ

ΚΑΙ ΤΑ ΔΕΚΙΘΟΦΟΡΑ ΙΧΘΥΔΙΑ (SAC-FRY) ΤΟΥ ΖΕΡΒΟΨΑΡΟΥ (Brachydanio rerio)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ζεβρόψαρο προέρχεται από την ακτή Coromandel της Ινδίας όπου κατοικεί στα υδατορεύματα ταχείας ροής. Πρόκειται για κοινό ψάρι ενυδρείου της οικογένειας των κυπρίνων. Πληροφορίες για τη φροντίδα και την καλλιέργειά του υπάρχουν στη βασική βιβλιογραφία για τα τροπικά ψάρια. Επισκόπηση των σχετικών με τη βιολογία και την χρήση του στην ιχθυοτροφία ερευνών έχει δημοσιευθεί από τον Laale (1).

Το μήκος του σπανίως υπερβαίνει τα 45 mm. Το σώμα του είναι κυλινδρικό με 7 – 9 οριζόντιες σκούρες μπλε στυλπνές ραβδώσεις. Οι ραβδώσεις καταλήγουν στα πτερύγια της ουράς και της έδρας. Η ράχη είναι φαιοπράσινη. Τα αρσενικά είναι πιο αδύνατα από τα θηλυκά. Τα θηλυκά είναι πιο στυλπνά και η γαστρική χώρα είναι διεσταλμένη, ιδίως πριν την ωοτοκία.

Τα ενήλικα ψάρια είναι ικανά να ανεχθούν μεγάλες διακυμάνσεις θερμοκρασίας, pH και σκληρότητας. Ωστόσο, για να είναι τα ψάρια υγιή και να παράγουν αυγά καλής ποιότητας, πρέπει να εξασφαλίζονται βέλτιστες συνθήκες.

Κατά την ωοτοκία το αρσενικό ακολουθεί το θηλυκό και εφορμά, με αποτέλεσμα να γονιμοποιούνται τα αυγά αμέσως μόλις αποβληθούν. Τα αυγά, τα οποία είναι διαφανή και δεν είναι κολλώδη, πέφτουν στο βυθό και ενδεχομένως τρώγονται από τους γεννήτορες. Η ωοτοκία επηρεάζεται από το φως. Εάν το πρωινό φως είναι κατάλληλο, το ψάρι αποβάλλει το γόνιμο τις πρώτες πρωινές ώρες.

Το θηλυκό μπορεί να γεννήσει παρτίδες εκατοντάδων αυγών ανά εβδομάδα.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΓΕΝΝΗΤΟΡΕΣ, ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΧΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΖΩΗΣ

Επιλέγεται κατάλληλος αριθμός υγιών ψαριών και αυτά κρατούνται σε κατάλληλα ύδατα (βλ. παράρτημα 4) για 2 τουλάχιστον εβδομάδες πριν την προβλεπόμενη ωοτοκία. Τα ψάρια θα πρέπει να έχουν ζευγαρώσει προς αναπαραγωγή μία τουλάχιστον φορά πριν παραχθεί η παρτίδα αυγών που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία. Η πυκνότητα των ψαριών κατά την περίοδο αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει 1 γραμμάριο ψαριών ανά λίτρο. Τακτικές αλλαγές του νερού ή χρήση συστημάτων καθαρισμού είναι προϋποθέσεις υψηλότερης πυκνότητας. Η θερμοκρασία στις δεξαμενές δοχεία συντήρησης πρέπει να διατηρείται στους (25 ± 2) °C. Η τροφή των ψαριών πρέπει να ποικίλλει και να αποτελείται π.χ. από αποξηραμένη τροφή του εμπορίου, ζωντανά νεοεκκολαφθέντα αρτέμια (Artemia), χιρονομίδες, Daphnia, λευκοσκώληκες (Enchytraeids).

Στη συνέχεια περιγράφονται συνοπτικά δύο διαδικασίες, οι οποίες στην πράξη έχουν οδηγήσει σε επαρκή παρτίδα γονιμοποιημένων αυγών για την εκτέλεση μιας δοκιμασίας.

- (3) Οκτώ θηλυκά και 16 αρσενικά τοποθετούνται σε δεξαμενή που περιέχει 50 λίτρα νερό αραίωσης και, χωρίς να εκτίθενται σε άμεσο φως, αφήνονται κατά το δυνατόν ανενόχλητα για 48 τουλάχιστον ώρες. Το απόγευμα της προηγούμενης μέρας, τοποθετείται στο βυθό του ενυδρείου δίσκος εναπόθεσης γόνου. Ο δίσκος αποτελείται από πλαίσιο (από πλεξιγκλάς ή άλλο κατάλληλο υλικό), ύψους 5 – 7 cm καλυμμένο στο επάνω μέρος με χονδρό δίχτυ 2 – 5 mm και στο κάτω μέρος με λεπτό δίχτυ 10 – 30 μm. Στο χονδρό δίχτυ του πλαισίου προσδένονται πολυάριθμα κομμάτια νάλων σκοινοϊού ζετυλιγμένου τα οποία αποτελούν σημεία εναπόθεσης αυγών. Αφού αφηθούν στο σκοτάδι για 12 ώρες, τα ψάρια φωτίζονται με απαλό φως που αποτελεί έναυσμα για την εναπόθεση των αυγών. 2 έως 4 ώρες μετά την εναπόθεση των αυγών, αφαιρείται ο δίσκος και συλλέγονται τα αυγά. Ο δίσκος εμποδίζει τα ψάρια να φάνε τα αυγά και ταυτοχρόνως διευκολύνει τη συλλογή τους. Τα ψάρια πρέπει να έχουν γεννήσει τουλάχιστον μία φορά πριν γεννήσουν τα αυγά που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία.

- (4) Πέντε έως 10 αρσενικά και θηλυκά ψάρια κρατούνται χωριστά τουλάχιστον 2 εβδομάδες πριν την προβλεπόμενη ωοτοκία. Μετά από 5-10 ημέρες, η γαστρική χώρα των θηλυκών διαστέλλεται και οι γεννητικές θηλές γίνονται ορατές. Τα αρσενικά δεν διαθέτουν θηλές. Η ωοτοκία γίνεται σε ειδικές δεξαμενές εξοπλισμένες με δικτυωτό ψευδοπάτο (όπως ανωτέρω). Η δεξαμενή γεμίζεται με νερό αραίωσης ώστε το βάθος του νερού πάνω από το δικτυωτό να είναι 5-10 cm. Ένα θηλυκό και δύο αρσενικά τοποθετούνται στη δεξαμενή την ημέρα πριν την προβλεπόμενη ωοτοκία. Η θερμοκρασία του νερού αυξάνεται βαθμιαία ένα βαθμό πάνω από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού. Η δεξαμενή αφήνεται στο σκοτάδι, κατά το δυνατόν χωρίς οχλήσεις. Το πρωί φωτίζεται με απαλό φως που αποτελεί έναυσμα για την εναπόθεση των αβγών. Μετά από 2-4 ώρες, αφαιρούνται τα ψάρια και συλλέγονται τα αβγά. Εάν χρειάζονται μεγαλύτερες παρτίδες αβγών από αυτές που μπορούν να παραχθούν από ένα θηλυκό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα όσες δεξαμενές αναπαραγωγής χρειάζονται. Καταγράφοντας το αναπαραγωγικό αποτέλεσμα καθενός από τα θηλυκά πριν τη δοκιμασία (μέγεθος παρτίδας και ποιότητα), μπορούν να επιλεγθούν για αναπαραγωγή τα θηλυκά με τις υψηλότερες αναπαραγωγικές επιδόσεις.

Τα αβγά μεταφέρονται στα δοκιμαστικά δοχεία με γυάλινες πιπέττες (εσωτερικής διαμέτρου όχι μικρότερης από 4 mm) εφοδιασμένες με ελαστική φούσκα αναρρόφησης. Η ποσότητα νερού που συνοδεύει τα αβγά κατά τη μεταφορά πρέπει να είναι όσο γίνεται μικρότερη αφού τα αβγά βυθίζονται στο νερό, βαρύτερα καθώς είναι, και μένουν έξω από την πιπέττα. Χρειάζεται προσοχή ώστε τα αβγά (και οι προνύμφες) να μην έρθουν σε επαφή με τον αέρα. Δείγμα της παρτίδας (ή δείγματα των παρτίδων) υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση για να εξασφαλιστεί ότι δεν εμφανίζονται ανωμαλίες στα πρώτα στάδια ανάπτυξης. Δεν επιτρέπεται η απολύμανση των αβγών.

Το ποσοστό θνησιμότητας των αβγών είναι υψηλότερο τις πρώτες 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Συχνά σημειώνεται θνησιμότητα 5 – 40 % σ' αυτό το διάστημα. Τα αβγά εκφυλίζονται λόγω ανεπιτυχούς γονιμοποίησης ή ατυχούς ανάπτυξης. Η ποιότητα της παρτίδας των αβγών φαίνεται να εξαρτάται από τα θηλυκά ψάρια καθώς μερικά θηλυκά παράγουν πάντοτε αβγά καλής ποιότητας, ενώ άλλα δεν τα καταφέρνουν ποτέ. Αλλά και ο ρυθμός ανάπτυξης και ο ρυθμός εκκόλαψης ποικίλλουν από τη μία παρτίδα στην άλλη. Τα επιτυχώς γονιμοποιημένα αβγά και οι προνύμφες (yolk sac larvae) σημειώνουν καλό ποσοστό επιβίωσης, συνήθως άνω του 90 %. Στους 25 °C τα αβγά εκκολάπτονται 3 – 5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση και ο λεκιθικός σάκος απορροφάται περίπου 13 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση.

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη έχει οριστεί ικανοποιητικά από τους Hisaoka και Battle (2). Λόγω της διαφάνειας των αβγών και των προνυμφών (post-hatch larvae) μετά την εκκόλαψη, είναι δυνατόν να παρακολουθείται η ανάπτυξη των ψαριών και να παρατηρείται η παρουσία δυσπλασιών. Περίπου 4 ώρες μετά την ωοτοκία, τα μη γονιμοποιημένα αβγά διακρίνονται από τα γονιμοποιημένα (3). Για την εν λόγω εξέταση, τα αβγά και οι προνύμφες (larvae) τοποθετούνται σε δοκιμαστικά δοχεία μικρού όγκου και μελετώνται κάτω από το μικροσκόπιο.

Οι συνθήκες της δοκιμασίας που εφαρμόζονται στα αρχικά στάδια ζωής απαριθμούνται στο παράρτημα 2. Οι βέλτιστες τιμές pH και σκληρότητας του ύδατος αραίωσης είναι 7,8 και 250 mg CaCO₃/l αντιστοίχως.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ

Προτείνεται προσέγγιση δύο σταδίων. Αρχικά αναλύονται στατιστικά τα στοιχεία για τη θνησιμότητα, τις ανωμαλίες ανάπτυξης και το χρόνο εκκόλαψης. Κατόπιν, για τις συγκεντρώσεις στις οποίες δεν έχουν ανιχνευθεί δυσμενείς επιπτώσεις σε καμία από αυτές τις παραμέτρους, αξιολογείται στατιστικά το μήκος του σώματος. Αυτή η προσέγγιση συνιστάται καθώς η τοξική ουσία μπορεί να επιφέρει επιλεκτικό θάνατο των μικρότερων ψαριών, παράταση του χρόνου εκκόλαψης και σοβαρές δυσπλασίες, και να οδηγήσει επομένως σε μη πραγματικά αποτελέσματα όσον αφορά τις μετρήσεις μήκους. Επιπλέον, ο αριθμός ψαριών προς μέτρηση του μήκους θα είναι περίπου ο ίδιος για κάθε αγωγή, οπότε εξασφαλίζεται η εγκυρότητα των στατιστικών δεδομένων.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ LC₅₀ ΚΑΙ EC₅₀

Το ποσοστό επιβίωσης των αβγών και των προνυμφών (larvae) υπολογίζεται και διορθώνεται βάσει της θνησιμότητας των μαρτύρων σύμφωνα με τον τύπο του Abbott (4):

$$P=100-\left(\frac{C-P}{C}\times 100\right)$$

όπου:

P = διορθωμένο % επιβίωσης

P' = % παρατηρηθείσα επιβίωση στη συγκέντρωση δοκιμής

C = % επιβίωση στους μάρτυρες

Εάν είναι δυνατόν, η LC₅₀ καθορίζεται με κατάλληλη μέθοδο στο τέλος της δοκιμασίας.

Για να συμπεριληφθούν στον στατιστικό υπολογισμό της EC₅₀ και οι μορφολογικές ανωμαλίες, μπορεί να ανατρέξει κανείς στον Stephan (5).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ LOEC ΚΑΙ NOEC

Ένας από τους στόχους της δοκιμασίας στα αβγά και τα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry) είναι να συγκριθούν οι μη μηδενικές συγκεντρώσεις με τις τιμές των μαρτύρων, δηλαδή να προσδιοριστεί η LOEC. Επομένως πρέπει να χρησιμοποιηθούν διαδικασίες πολλαπλής σύγκρισης (6)(7)(8)(9)(10).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. **10**, 121-173.
- (2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., **102**, pp 311.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabdrbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, **2**, pp 173-181.
- (4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp 1-333.
- (5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp 69-81.
- (6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, **20**, 482-491.
- (8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, **27**, pp 103-117.
- (9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics **28**, pp 519-531.
- (10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ, ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΕΙΔΗ

ΕΙΔΗ	ΘΕΡΜ. (°C)	ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ (0/00)	ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΟΣ (ώρες)	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ (ημέρες)		ΤΥΠΙΚΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ	ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΜΑΡΤΥΡΩΝ, (ΕΛΑΧΙΣΤΗ %)	
				Έμβρυα	Δοκιμασία σε Λεκιθο- φόρα ιχθύδια (sac- fry)		Επιτυχία εκκόλαψης	Μετά την εκκόλαψη
ΓΛΥΚΑ ΝΕΡΑ								
<i>Brachydanio rerio</i> Ζεβρόψαρο	25 ± 1	–	12 – 16	3 – 5	8 - 10	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 5 ημέρες μετά την εκκόλαψη (8-10 ημέρες)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> γραβανή (αμερικανική) πέστροφα	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	–	0 ^(a)	30 – 35	25 - 30	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 20 ημέρες μετά την εκκόλαψη (50-55 ημέρες)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Κοινός κυπρίνος (σαζάνι)	21 – 25	–	12 – 16	5	> 4	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (8- 9 ημέρες)	80	75

<i>Oryzias latipes</i> γιαπωνέζικο ριζόψαρο/medaka	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	–	12 – 16	8 – 11	4 - 8	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 5 ημέρες μετά την εκκόλαψη (13- 16 ημέρες)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> χοντροκέφαλη τσίμα	25 ± 2	–	16	4 – 5	5	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (8- 9 ημέρες)	60	70

⁽¹⁾Για έμβρυα ⁽²⁾Για προνύμφες ^(a)Σκοτάδι για τα έμβρυα και τις προνύμφες έως μία εβδομάδα μετά την εκκόλαψη εκτός εάν επιθεωρούνται. Κατόπιν χαμηλό φως καθ' όλη τη δοκιμασία

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ, ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΕΙΔΗ ΓΙΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΥΠΑΡΧΕΙ ΕΠΑΡΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΙΔΗ	ΘΕΡΜ. (°C)	ΑΛΑΤΟ- ΤΗΤΑ (0/00)	ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΟΣ (ώρες)	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ (ημέρες)		ΤΥΠΙΚΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΕΚΙΘΟΦΟΡΑ ΙΧΘΥΔΙΑ (SAC-FRY)	ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ (ΕΛΑΧΙΣΤΗ %)	
				Εμβρυα	Δοκιμασία σε Λεκιθο- φόρα ιχθύδια (sac-fry)		Επιτυχία της εκκόλαψης	Μετά την εκκόλαψη
ΓΑΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ								
<i>Carassius auratus</i> Χρυσόψαρο	24 ± 1	–	–	3 – 4	> 4	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (7 ημέρες)	–	80
<i>Lepomis macrochirus</i> Blugill sunfish	21 ± 1	–	16	3	> 4	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (7 ημέρες)	–	75
ΑΛΜΥΡΟΥ ΝΕΡΟΥ								
<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside	22 - 25	15 – 22	12	1.5	10	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 5 ημέρες μετά την εκκόλαψη (6-7 ημέρες)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Ρέγγα	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 3 ημέρες μετά την εκκόλαψη (23-27 ημέρες)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Βακαλάος	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 3 ημέρες μετά την εκκόλαψη (18 ημέρες)	60	80

<i>Cyprinodon variegatus</i> πολύχρωμη τσίμα	25 ± 1	15 – 30	12	–	–	Γο συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4/7 ημέρες μετά την εκκόλαψη (28 ημέρες)	> 75	80
---	--------	---------	----	---	---	--	------	----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΥΔΑΤΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

ΟΥΣΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
Αιωρούμενα σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 µg/l
Υπολειμματικό χλώριο	< 10 µg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα συν πολυχλωριούχα διφαινύλια.	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

Γ.16. ΜΕΛΙΣΣΕΣ - ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης οξείας τοξικότητας αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 213 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόκειται για μια εργαστηριακή μέθοδο προβλεπόμενη για τη μελέτη της οξείας τοξικότητας που παρατηρείται σε ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών ως αποτέλεσμα της λήψεως φυτοπροστατευτικών προϊόντων και άλλων χημικών ουσιών από το στόμα.

Κατά την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας ουσίας, ενδέχεται να χρειαστεί να προσδιοριστεί η οξεία τοξικότητα ως αποτέλεσμα της λήψεως από το στόμα σε περιπτώσεις π.χ. κατά τις οποίες θεωρείται πιθανή η έκθεση μελισσών σε συγκεκριμένη χημική ουσία. Η υπόψη μελέτη πραγματοποιείται για να προσδιοριστεί η εγγενής τοξικότητα φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών στις μέλισσες. Με βάση τα αποτελέσματα θα κριθεί κατά πόσον χρειάζεται να γίνει περαιτέρω αξιολόγηση. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κλιμακωτά προγράμματα αξιολόγησης των κινδύνων που διατρέχουν οι μέλισσες από τα φυτοφάρμακα, με βάση τη συνεχή εξέλιξη των εργαστηριακών δοκιμών τοξικότητας σε πειράματα ημιπεδίου και πεδίου (1). Τα φυτοφάρμακα μπορούν να δοκιμάζονται ως δραστικές ουσίες ή ως παρασκευάσματα.

Για τη διαπίστωση της ευαισθησίας των μελισσών και της ακρίβειας της διαδικασίας χρησιμοποιείται πρότυπη τοξική ουσία.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξεία τοξικότητα ως αποτέλεσμα λήψεως από το στόμα: είναι οι βλαβερές συνέπειες που εμφανίζονται το αργότερο μέσα σε 96 ώρες αφότου χορηγηθεί από το στόμα μία δόση της δοκιμαζόμενης ουσίας.

Δόση: είναι η αναλυσόμενη ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκφράζεται σε μάζα (μg) δοκιμαζόμενης ουσίας ανά πειραματόζωο (μg/μέλισσα). Καθώς οι μέλισσες εκτρέφονται ομαδικά, δεν μπορεί να υπολογιστεί η πραγματική δόση ανά μέλισσα, αλλά υπολογίζεται κατ'εκτίμηση μια μέση δόση (συνολική αναλωθείσα ποσότητα/αριθμός μελισσών ανά κλωβό).

LD₅₀ (μέση θανατηφόρα δόση) από το στόμα: είναι η στατιστικώς προκύπτουσα δόση ουσίας, η οποία, χορηγούμενη από το στόμα, μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο σε ποσοστό 50 % των ζώων. Η τιμή LD₅₀ εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα. Προκειμένου για φυτοφάρμακα, η δοκιμαζόμενη ουσία μπορεί να είναι είτε δραστική ουσία είτε παρασκεύασμα περιέχον μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες.

Θνησιμότητα: ζώο καταγράφεται ως νεκρό όταν είναι εντελώς ακίνητο.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών (*Apis mellifera*) εκτίθενται σε μια σειρά δόσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας μέσα σε διάλυμα σακχαρόζης. Στη συνέχεια, τους παρέχεται η ίδια τροφή, ελεύθερη όμως της δοκιμαζόμενης ουσίας. Καταγράφεται η θνησιμότητα σε καθημερινή βάση επί 48 τουλάχιστον ώρες, και γίνεται σύγκριση με τις τιμές που καταγράφονται στους μάρτυρες. Εάν το ποσοστό θνησιμότητας αυξάνεται ανάμεσα στις 24 και τις 48 ώρες ενώ η θνησιμότητα των μαρτύρων παραμένει σε αποδεκτά επίπεδα, δηλ. $\leq 10\%$, ενδείκνυται παράταση της δοκιμασίας μέχρι το πολύ 96 h. Τα αποτελέσματα αναλύονται για να υπολογιστεί η LD₅₀ μετά παρέλευση 24 h και 48 h και, σε περίπτωση παράτασης της δοκιμασίας, μετά παρέλευση 72 h και 96 h.

1.4 ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμασίας είναι οι εξής δύο:

- ο μέσος όρος θνησιμότητας επί του συνολικού αριθμού των μαρτύρων να μην υπερβαίνει ποσοστό 10 % στο τέλος της δοκιμασίας·
- η LD₅₀ της πρότυπης τοξικής ουσίας να βρίσκεται μέσα στην καθορισμένη περιοχή τιμών.

1.5 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.5.1 Πώς επιλέγονται οι μέλισσες

Χρησιμοποιούνται νεαρά ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών, δηλαδή μέλισσες της ίδιας ηλικίας, διαιτητικής αγωγής, φυλής, κ.λπ., προερχόμενες από υγιείς αποικίες με βασίλισσα, επαρκώς τρεφόμενες, κατά το δυνατόν χωρίς ασθένειες, τέλος δε με φυσιολογία και ιστορικό γνωστά. Οι μέλισσες επιλέγονται το πρωί της ίδιας ημέρας κατά την οποία θα γίνει η δοκιμασία ή το βράδυ της προηγούμενης και φυλάσσονται στις συνθήκες της δοκιμασίας μέχρι την επομένη. Μέλισσες συλλεγόμενες από πλαίσια χωρίς μελισσόπουλα είναι κατάλληλες. Η συλλογή μελισσών νωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο πρέπει να αποφεύγεται γιατί τότε η φυσιολογία τους παρουσιάζει μεταβολές. Εάν πρέπει να γίνουν δοκιμασίες νωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο, οι μέλισσες τοποθετούνται σε εκκολαπτήριο και ως τροφή τους παρέχεται επί μία εβδομάδα “bee bread” (γύρη από την κηρήθρα) και διάλυμα σακχαρόζης. Μέλισσες που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με χημικές ουσίες, όπως π.χ. αντιβιοτικά, προϊόντα anti-varroa κ.λπ., δεν χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες μελέτης τοξικότητας επί τέσσερις εβδομάδες μετά τη λήξη της τελευταίας αγωγής.

1.5.2 Στέγη και τροφή

Οι χρησιμοποιούμενοι κλωβοί θα πρέπει να είναι ευάεροι και να καθαρίζονται εύκολα. Οι κλωβοί μπορεί να είναι π.χ. από ανοξείδωτο χάλυβα, συρματοπλέγμα ή πλαστικό ή ακόμη να είναι ξύλινοι κλωβοί μιας χρήσεως, κ.λπ. Προτιμώνται ομάδες δέκα μελισσών ανά κλωβό. Το μέγεθος των κλωβών για τις δοκιμασίες θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να υπάρχει αρκετός χώρος για όλες τις μέλισσες.

Οι μέλισσες φυλάσσονται στον χώρο του πειράματος, που θα πρέπει να είναι σκοτεινός και να έχει θερμοκρασία $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$. Καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας καταγράφεται η σχετική υγρασία, που κανονικά πρέπει να κυμαίνεται από 50 έως 70 %. Οι διάφοροι χειρισμοί (συμπεριλαμβάνονται παροχή τροφής και παρατηρήσεις) μπορούν να γίνονται στο φως της ημέρας. Ως τροφή χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα σακχαρόζης με τελική συγκέντρωση 500 g/l (50 % κ.ό). Μετά τη χορήγηση των δόσεων δοκιμασίας, παρέχεται τροφή κατά βούληση (*ad libitum*). Η ταΐστρα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να είναι δυνατή η καταγραφή της προσλαμβανόμενης τροφής για κάθε κλωβό (βλ. 1.6.3.1). Ως τέτοια μπορεί να χρησιμοποιηθεί γυάλινος σωλήνας μήκους 50 mm και πλάτους 10 mm, που θα στενεύει στο ανοιχτό άκρο και θα έχει διάμετρο 2 mm.

1.5.3 Προετοιμασία των μελισσών

Οι μέλισσες τοποθετούνται τυχαίως στους κλωβούς, οι οποίοι με τη σειρά τους τοποθετούνται επίσης τυχαίως στο δωμάτιο του πειράματος.

Δύο ώρες προτού αρχίσει η δοκιμασία, οι μέλισσες μπορούν να μείνουν χωρίς τροφή. Συνιστάται η μη χορήγηση τροφής πριν τη δοκιμασία, ώστε κατά την έναρξη όλες οι μέλισσες να βρίσκονται στην ίδια κατάσταση ως προς το περιεχόμενο του πεπτικού σωλήνα. Προτού αρχίσει η δοκιμασία, εκβάλλονται οι ετοιμοθάνατες μέλισσες και αντικαθίστανται από υγιείς.

1.5.4 Παρασκευή των δοκιμαστικών διαλυμάτων

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία είναι υδατοδιαλυτή, προστίθεται απευθείας σε διάλυμα σακχαρόζης 50 %. Για προϊόντα χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν έκδοχα (π.χ. οργανικοί διαλύτες, γαλακτωματοποιητές ή πρόσθετα διασποράς) χαμηλής τοξικότητας για τις μέλισσες (π.χ. ακετόνη, διμεθυλοφορμαμίδιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο). Η συγκέντρωση του εκδόχου εξαρτάται από τη διαλυτότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας και πρέπει να είναι η ίδια για κάθε συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εντούτοις, συγκέντρωση του εκδόχου ίση με 1 % είναι κατά κανόνα κατάλληλη και δεν χρειάζεται μεγαλύτερη.

Απαιτούνται κατάλληλα διαλύματα για τους μάρτυρες· όταν δηλαδή χρησιμοποιείται διαλύτης ή πρόσθετο διασποράς για τη διαλυτοποίηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο χωριστές ομάδες μαρτύρων: η μία θα εκτεθεί σε υδατικό διάλυμα και η άλλη σε διάλυμα σακχαρόζης με τον διαλύτη στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στα διαλύματα με την εκάστοτε δόση της δοκιμαζόμενης ουσίας (δοκιμαστικά διαλύματα).

1.6 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.6.1 Ομάδες υπό δοκιμασία και ομάδες μάρτυρες

Ο αριθμός των δόσεων και των επαναλήψεων της δοκιμασίας για κάθε δόση θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις στατιστικές απαιτήσεις για προσδιορισμό της τιμής LD₅₀ με όριο εμπιστοσύνης 95%. Απαιτούνται κανονικά για τη δοκιμασία πέντε συγκεντρώσεις που θα διαφέρουν η μία από την άλλη κατά συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 2,2 και που θα καλύπτουν την περιοχή τιμών LD₅₀. Εντούτοις, ο συντελεστής αραιώσης και ο αριθμός δόσεων πρέπει να προσδιορίζονται σε σχέση με την κλίση της καμπύλης τοξικότητας (δόση/θνησιμότητα) και με συνεκτίμηση της στατιστικής μεθόδου βάσει της οποίας θα γίνει ανάλυση των αποτελεσμάτων. Μια δοκιμασία εντοπισμού εύρους τιμών εξυπηρετεί την επιλογή των κατάλληλων δόσεων.

Η δοκιμασία γίνεται με τρεις τουλάχιστον όμοιες ομάδες, δέκα μελισσών η καθεμιά, για την κάθε συγκέντρωση (δόση). Επιπλέον δοκιμάζονται τρεις τουλάχιστον ομάδες μαρτύρων, δέκα μελισσών η καθεμιά. Ομάδες μαρτύρων πρέπει επίσης να προβλεφθούν για τους χρησιμοποιούμενους διαλύτες/φορείς (βλ. 1.5.4).

1.6.2 Πρότυπη τοξική ουσία

Στις δοκιμασίες πρέπει να συμπεριληφθεί μια πρότυπη τοξική ουσία και να επιλεγούν τρεις τουλάχιστον δόσεις ώστε να καλυφθούν οι αναμενόμενες τιμές LD₅₀. Για κάθε δόση χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον κλωβί με δέκα μέλισσες ο καθένας. Ως πρότυπη τοξική ουσία προτιμάται ο διμεθοϊκός εστέρας, για τον οποίο καταγράφονται τιμές LD₅₀-24 h στην περιοχή τιμών 0,10-0,35 μg δραστικής ουσίας ανά μέλισσα (2). Μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιηθούν κι άλλες πρότυπες τοξικές ουσίες (π.χ. παραθείο) όταν υπάρχουν επαρκή δεδομένα προς επαλήθευση της αναμενόμενης απόκρισης στην εκάστοτε δόση.

1.6.3 κθεση

1.6.3.1 Χορήγηση των δόσεων

Κάθε δοκιμαζόμενη ομάδα μελισσών εκτίθεται σε 100-200 μl υδατικού διαλύματος σακχαρόζης 50 %, το οποίο περιέχει τη δοκιμαζόμενη ουσία στην κατάλληλη συγκέντρωση. Για προϊόντα χαμηλής διαλυτότητας, χαμηλής τοξικότητας ή χαμηλής συγκέντρωσης μέσα στο παρασκεύασμα απαιτείται μεγαλύτερος όγκος, αφού θα χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες αναλογίες στο διάλυμα σακχαρόζης. Παρακολουθείται η ποσότητα τροφής (διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία) που καταναλώνει η κάθε ομάδα. Μετά παρέλευση 3-4 ωρών (οπότε έχει κατά κανόνα καταναλωθεί η τροφή), αφαιρείται η ταΐστρα από τον κλωβό και αντικαθίσταται με άλλη που περιέχει σκέτο διάλυμα σακχαρόζης, το οποίο και προσφέρεται κατά βούληση (*ad libitum*). Η απόρριψη της τροφής σε περιπτώσεις μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ορισμένων ουσιών ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα μηδενική ή ελάχιστη απορρόφηση τροφής. Μετά παρέλευση 6 το πολύ ωρών, η μη καταναλωθείσα τροφή πρέπει να αντικατασταθεί με σκέτο διάλυμα σακχαρόζης. Υπολογίζεται η καταναλωθείσα ποσότητα τροφής (π.χ. μετρείται ο όγκος ή το βάρος του εναπομένουτος διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία).

1.6.3.2 Διάρκεια

Η δοκιμασία διαρκεί κατά προτίμηση 48 h. Εάν μετά τις πρώτες 24 h η θνησιμότητα εξακολουθεί να αυξάνει κατά περισσότερο από 10%, η διάρκεια της δοκιμασίας παρατείνεται μέχρι το πολύ 96 h υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα των μαρτύρων δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

1.6.4 Παρατηρήσεις

Η θνησιμότητα καταγράφεται αφού περάσουν 4 h μετά την έναρξη της δοκιμασίας και στη συνέχεια μετά παρέλευση 24 h και 48 h (εννοείται μετά τη χορήγηση της εκάστοτε δόσης). Εάν χρειαστεί να παραταθεί η διάρκεια των παρατηρήσεων, πρέπει να συνεχιστούν οι αξιολογήσεις ανά 24 h, μέχρι το πολύ 96 h υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα των μαρτύρων δεν υπερβαίνει ποσοστό 10%.

Υπολογίζεται η ποσότητα τροφής που κατανάλωσε κάθε ομάδα. Από τη σύγκριση των ρυθμών πρόσληψης τροφής με ή χωρίς τη δοκιμαζόμενη ουσία μέσα σε χρόνο 6 h, μπορούν να προκύψουν συμπεράσματα για το κατά πόσον προσλαμβάνεται ευχάριστα η τροφή που περιέχει τη δοκιμαζόμενη ουσία.

Καταγράφεται κάθε είδους αφύσικη συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

1.6.5 Οριακή δοκιμασία

Σε ορισμένες περιπτώσεις (όταν για παράδειγμα μια δοκιμαζόμενη ουσία αναμένεται να είναι χαμηλής τοξικότητας), ενδέχεται να πραγματοποιηθεί μια οριακή δοκιμασία, με τη χρησιμοποίηση 100 µg δραστικής ουσίας ανά μέλισσα για να αποδειχτεί ότι η τιμή της LD₅₀ είναι μεγαλύτερη από την τιμή αυτή. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται σε τρεις όμοιες ομάδες για την εκάστοτε δόση, τους αντίστοιχους μάρτυρες, τον υπολογισμό της καταναλωθείσας ποσότητας διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία, τέλος δε για την πρότυπη τοξική ουσία. Εάν σημειωθούν θάνατοι, θα πρέπει να γίνει πλήρης μελέτη. Εάν παρατηρηθούν επιπτώσεις σχεδόν θανατηφόρες (βλ. 1.6.4), πρέπει να καταγραφούν.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

2.1 ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφανίζονται, για κάθε ομάδα που εκτίθεται στη δοκιμαζόμενη ουσία, καθώς και για τις ομάδες των μαρτύρων και τις ομάδες που εκτίθενται στην πρότυπη τοξική ουσία, ο αριθμός των χρησιμοποιηθεισών μελισσών, η θνησιμότητα ανά χρονικό διάστημα παρατήρησης και ο αριθμός μελισσών με αφύσικη συμπεριφορά. Τα δεδομένα τα σχετικά με τη θνησιμότητα αναλύονται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους (π.χ. ανάλυση probit, κινητός μέσος, διωνυμική πιθανότητα) (3)(4). Χαράσσονται καμπύλες δόσης-απόκρισης για κάθε συνιστώμενη χρονική διάρκεια παρατήρησης και υπολογίζονται οι κλίσεις των καμπυλών και οι μέσες θανατηφόρες δόσεις (LD₅₀) με όριο εμπιστοσύνης 95 %. Με τη βοήθεια της διόρθωσης Abbott (4)(5), μπορούν να γίνουν διορθώσεις της θνησιμότητας των μαρτύρων. Όταν δεν καταναλωθεί πλήρως το διάλυμα με τη δοκιμαζόμενη ουσία, πρέπει να προσδιοριστεί η δόση της ανά ομάδα καταναλωθείσας δοκιμαζόμενης ουσίας. Η LD₅₀ πρέπει να εκφράζεται σε µg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα.

2.2 ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1 Δοκιμαζόμενη ουσία

- φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες που αφορούν τη δοκιμασία (π.χ. σταθερότητα στο νερό, τάση ατμών).
- χημικά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων συντακτικός τύπος, καθαρότητα (προκειμένου για φυτοφάρμακα, ταυτότητα και συγκέντρωση των δραστικών ουσιών).

2.2.2 Χρησιμοποιηθέν είδος

- επιστημονικό όνομα, φυλή, ηλικία κατά προσέγγιση (σε εβδομάδες), τρόπος και ημερομηνία συλλογής.
- πληροφορίες για τις αποικίες μελισσών από τις οποίες προέρχονται οι μέλισσες που χρησιμοποιήθηκαν για την υπόψη μελέτη (υγεία, τυχόν ασθένειες στα ενήλικα άτομα, τυχόν προηγούμενη αγωγή κ.λπ.).

2.2.3 Συνθήκες της δοκιμασίας

- θερμοκρασία και σχετική υγρασία του πειραματικού χώρου.
- τύπος, μέγεθος και υλικό των κλωβών.
- μέθοδοι παρασκευής του πυκνού διαλύματος και των δοκιμαστικών διαλυμάτων (εάν χρησιμοποιηθεί διαλύτης αναφέρεται υποχρεωτικά, καθώς και η συγκέντρωση αυτού).
- περιγραφή της δοκιμασίας σε γενικές γραμμές (πόσες και ποιες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός μαρτύρων, αριθμός κλωβών και μελισσών ανά κλωβό για κάθε συγκέντρωση και ομάδα μαρτύρων).
- ημερομηνία της δοκιμασίας.

2.2.4

Αποτελέσματα

- αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικής μελέτης εντοπισμού εύρους τιμών·
- ακατέργαστα δεδομένα: θνησιμότητα για κάθε δόση και χρονική διάρκεια παρατήρησης·
- γραφικές παραστάσεις δόσης-απόκρισης στο τέλος της δοκιμασίας·
- τιμές LD₅₀ με όριο εμπιστοσύνης 95 % για κάθε χρονική διάρκεια παρατήρησης, ουσία και πρότυπη τοξική ουσία·
- στατιστικές μέθοδοι προσδιορισμού της LD₅₀·
- θνησιμότητα κατά τους ελέγχους·
- άλλες παρατηρήσεις ή μετρήσεις βιολογικών επιπτώσεων όπως π.χ. αφύσικη συμπεριφορά των μελισσών (συμπεριλαμβάνεται η απόρριψη της δόσης), ρυθμός πρόσληψης τροφής αναλόγως εάν περιέχει ή όχι τη δοκιμαζόμενη ουσία·
- τυχόν παρέκκλιση από τις περιγραφόμενες εδώ διαδικασίες της δοκιμασίας και κάθε άλλη σχετική πληροφορία.

3.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

Γ.17. ΜΕΛΙΣΣΕΣ - ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΑΦΗ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης οξείας τοξικότητας αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 214 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόκειται για μια εργαστηριακή μέθοδο προβλεπόμενη για τη μελέτη της οξείας τοξικότητας που παρατηρείται σε ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών ως αποτέλεσμα της επαφής με φυτοπροστατευτικά προϊόντα και άλλα χημικές ουσίες.

Κατά την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας ουσίας, ενδέχεται να χρειαστεί να προσδιοριστεί η οξεία τοξικότητα που προκαλείται με την επαφή σε περιπτώσεις π.χ. κατά τις οποίες θεωρείται πιθανή η έκθεση μελισσών σε συγκεκριμένη χημική ουσία. Η υπόψη μελέτη πραγματοποιείται για να προσδιοριστεί η εγγενής τοξικότητα φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών στις μέλισσες. Με βάση τα αποτελέσματα θα κριθεί κατά πόσον χρειάζεται να γίνει περαιτέρω αξιολόγηση. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κλιμακωτά προγράμματα αξιολόγησης των κινδύνων που διατρέχουν οι μέλισσες από τα φυτοφάρμακα, με βάση τη συνεχή εξέλιξη των εργαστηριακών δοκιμών τοξικότητας σε πειράματα ημιπεδίου και πεδίου (1). Τα φυτοφάρμακα μπορούν να δοκιμάζονται ως δραστικές ουσίες ή ως παρασκευάσματα.

Για τη διαπίστωση της ευαισθησίας των μελισσών και της ακρίβειας της διαδικασίας χρησιμοποιείται πρότυπη τοξική ουσία.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξεία τοξικότητα που προκαλείται με την επαφή: είναι οι βλαβερές συνέπειες που εμφανίζονται το αργότερο μέσα σε 96 ώρες αφότου εφαρμοστεί τοπικά μία δόση της δοκιμαζόμενης ουσίας.

Δόση: είναι η εφαρμοζόμενη ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκφράζεται σε μάζα (μg) δοκιμαζόμενης ουσίας ανά πειραματόζωο (μg/μέλισσα).

LD₅₀ (μέση θανατηφόρα δόση) με την επαφή: είναι η στατιστικώς προκύπτουσα δόση ουσίας, η οποία μπορεί με την επαφή να προκαλέσει τον θάνατο σε ποσοστό 50 % των ζώων. Η τιμή LD₅₀ εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα. Προκειμένου για φυτοφάρμακα, η δοκιμαζόμενη ουσία μπορεί να είναι είτε δραστική ουσία είτε παρασκεύασμα περιέχον μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες.

Θνησιμότητα: ζώο καταγράφεται ως νεκρό όταν είναι εντελώς ακίνητο.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών (*Apis mellifera*) εκτίθενται σε μια σειρά δόσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας διαλελυμένης σε κατάλληλο φορέα, με άμεση εφαρμογή σταγονιδίων στον θώρακα. Η διάρκεια της δοκιμασίας είναι 48 h. Εάν το ποσοστό θνησιμότητας αυξάνεται ανάμεσα στις 24 και τις 48 ώρες ενώ η θνησιμότητα των μαρτύρων παραμένει σε αποδεκτά επίπεδα, δηλ. ≤10%, ενδείκνυται παράταση της δοκιμασίας μέχρι το πολύ 96 h. Τα αποτελέσματα αναλύονται για να υπολογιστεί η LD₅₀ μετά παρέλευση 24 h και 48 h και, σε περίπτωση παράτασης της δοκιμασίας, μετά παρέλευση 72 h και 96 h.

1.4 ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμασίας είναι οι εξής δύο:

- ο μέσος όρος θνησιμότητας επί του συνόλου των μαρτύρων να μην υπερβαίνει ποσοστό 10 % στο τέλος της δοκιμασίας·
- η LD₅₀ της πρότυπης τοξικής ουσίας να βρίσκεται μέσα στην καθορισμένη περιοχή τιμών.

1.5 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.5.1 Πώς επιλέγονται οι μέλισσες

Χρησιμοποιούνται νεαρά ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών, δηλαδή μέλισσες της ίδιας ηλικίας, διατροφικής αγωγής, φυλής, κ.λπ., προερχόμενες από υγιείς αποικίες με βασίλισσα, επαρκώς τρεφόμενες, κατά το δυνατόν χωρίς ασθένειες, τέλος δε με φυσιολογία και ιστορικό γνωστά. Οι μέλισσες επιλέγονται το πρωί της ίδιας ημέρας κατά την οποία θα γίνει η δοκιμασία ή το βράδυ της προηγούμενης και φυλάσσονται στις συνθήκες της δοκιμασίας μέχρι την επομένη. Μέλισσες συλλεγόμενες από πλαίσια χωρίς μελισσόπουλα είναι κατάλληλες. Η συλλογή μελισσών χωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο πρέπει να αποφεύγεται γιατί τότε η φυσιολογία τους παρουσιάζει μεταβολές. Εάν πρέπει να γίνουν δοκιμασίες χωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο, οι μέλισσες τοποθετούνται σε εκκολαπτήριο και ως τροφή τους παρέχεται επί μία εβδομάδα “bee bread” (γύρη από την κηρήθρα) και διάλυμα σακχαρόζης. Μέλισσες που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με χημικές ουσίες, όπως π.χ. αντιβιοτικά, προϊόντα anti-varroa κ.λπ., δεν χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες μελέτης τοξικότητας επί τέσσερις εβδομάδες μετά τη λήξη της τελευταίας αγωγής.

1.5.2 Στέγη και τροφή

Οι χρησιμοποιούμενοι κλωβοί θα πρέπει να είναι ευάεροι και να καθαρίζονται εύκολα. Οι κλωβοί μπορεί να είναι π.χ. από ανοξείδωτο χάλυβα, συρματοπλεγμά ή πλαστικό ή ακόμη να είναι ξύλινοι κλωβοί μιας χρήσεως, κ.λπ. Προτιμώνται ομάδες δέκα μελισσών ανά κλωβό. Το μέγεθος των κλωβών για τις δοκιμασίες θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να υπάρχει αρκετός χώρος για όλες τις μέλισσες.

Οι μέλισσες φυλάσσονται στον χώρο του πειράματος, που θα πρέπει να είναι σκοτεινός και να έχει θερμοκρασία (25 ± 2) °C. Καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας καταγράφεται η σχετική υγρασία, που κανονικά πρέπει να κυμαίνεται από 50 έως 70 %. Οι διάφοροι χειρισμοί (συμπεριλαμβάνονται παροχή τροφής και παρατηρήσεις) μπορούν να γίνουν στο φως της ημέρας. Ως τροφή χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα σακχαρόζης με τελική συγκέντρωση 500 g/l (50% κ.δ) και παρέχεται κατά βούληση (*ad libitum*) κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας με τη βοήθεια ειδικής ταϊστρας μελισσών. Ως τέτοια μπορεί να χρησιμοποιηθεί γυάλινος σωλήνας μήκους 50 mm και πλάτους 10 mm, που θα στενεύει στο ανοιχτό άκρο και θα έχει διάμετρο 2 mm.

1.5.3 Προετοιμασία των μελισσών

Οι μέλισσες αναισθητοποιούνται με διοξείδιο του άνθρακα ή με άζωτο, ώστε να είναι δυνατή η τοπική εφαρμογή της δοκιμαζόμενης ουσίας. Η χρησιμοποιούμενη ποσότητα αναισθητικού και ο χρόνος έκθεσης πρέπει να είναι τα ελάχιστα δυνατά. Προτού αρχίσει η δοκιμασία, εκβάλλονται οι ετοιμοθάνατες μέλισσες και αντικαθίστανται από υγιείς.

1.5.4 Παρασκευή των δοκιμαστικών διαλυμάτων

Η δοκιμαζόμενη ουσία εφαρμόζεται υπό μορφή διαλύματος μέσα σε κατάλληλο φορέα, δηλ. σε οργανικό διαλύτη ή σε υδατικό διάλυμα με αντιδραστήριο διαβροχής. Ως οργανικός διαλύτης προτιμάται η ακετόνη, μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν κι άλλοι διαλύτες (π.χ. διμεθυλοφορμαμίδιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο). Προκειμένου για υδατοδιαλυτά παρασκευάσματα και οργανικές ενώσεις αδιάλυτες σε οργανικούς διαλύτες, τα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας καλό είναι, για ευκολότερη εφαρμογή τους, να ετοιμάζονται μέσα σε ασθενές διάλυμα ενός αντιδραστηρίου διαβροχής του εμπορίου (π.χ. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

Απαιτούνται κατάλληλα διαλύματα για τους μάρτυρες όταν δηλαδή χρησιμοποιείται διαλύτης ή πρόσθετο διασποράς για τη διαλυτοποίηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο χωριστές ομάδες μαρτύρων η μία θα εκτεθεί σε υδατικό διάλυμα και η άλλη σε διάλυμα που θα περιέχει διαλύτη/πρόσθετο διασποράς.

1.6 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.6.1 Ομάδες υπό δοκιμασία και ομάδες μάρτυρες

Ο αριθμός των δόσεων και των επαναλήψεων της δοκιμασίας για κάθε δόση θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις στατιστικές απαιτήσεις για προσδιορισμό της τιμής LD₅₀ με όριο εμπιστοσύνης 95 %. Απαιτούνται κανονικά για τη δοκιμασία πέντε συγκεντρώσεις που θα διαφέρουν η μία από την άλλη κατά συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 2,2 και που θα καλύπτουν την περιοχή τιμών LD₅₀. Εντούτοις, ο αριθμός των δόσεων πρέπει να προσδιορίζεται σε σχέση με την κλίση της καμπύλης τοξικότητας (δόση/θνησιμότητα) και με συνεκτίμηση της στατιστικής μεθόδου βάσει της οποίας θα γίνει ανάλυση των αποτελεσμάτων. Μια δοκιμασία εντοπισμού εύρους τιμών εξυπηρετεί την επιλογή των κατάλληλων δόσεων.

Η δοκιμασία γίνεται με τρεις τουλάχιστον όμοιες ομάδες, δέκα μελισσών η καθεμιά, για την κάθε συγκέντρωση (δόση).

Επιπλέον δοκιμάζονται τρεις τουλάχιστον ομάδες μαρτύρων, δέκα μελισσών η καθεμιά. Εάν χρησιμοποιηθεί οργανικός διαλύτης ή αντιδραστήριο διαβροχής, πρέπει να προβλεφθούν τρεις επιπλέον ομάδες μαρτύρων δέκα μελισσών η καθεμιά για τον διαλύτη ή το αντιδραστήριο διαβροχής.

1.6.2 Πρότυπη τοξική ουσία

Στις δοκιμασίες πρέπει να συμπεριληφθεί μια πρότυπη τοξική ουσία και να επιλεγούν τρεις τουλάχιστον δόσεις ώστε να καλυφθούν οι αναμενόμενες τιμές LD₅₀. Για κάθε δόση χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον κλωβοί με δέκα μέλισσες ο καθένας. Ως πρότυπη τοξική ουσία προτιμάται ο διμεθοικός εστέρας, για τον οποίο καταγράφονται τιμές LD₅₀-24 h στην περιοχή τιμών 0,10-0,35 μg δραστηκής ουσίας ανά μέλισσα (2). Μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιηθούν κι άλλες πρότυπες τοξικές ουσίες (π.χ. παραθειό) όταν υπάρχουν επαρκή δεδομένα προς επαλήθευση της αναμενόμενης απόκρισης στην εκάστοτε δόση.

1.6.3 κθεση

1.6.3.1 Χορήγηση δόσεων

Η τοπική εφαρμογή του διαλύματος γίνεται χωριστά σε καθεμιά από τις αναισθητοποιημένες μέλισσες. Η επιλογή των μελισσών για τις διάφορες δόσεις και ελέγχους γίνεται τυχαία. Στη ραχιαία πλευρά της θωρακικής χώρας εφαρμόζεται με τη βοήθεια ειδικής μικροδιάταξης 1 μl διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία στην κατάλληλη συγκέντρωση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κι άλλοι όγκοι, αυτό όμως πρέπει να αιτιολογηθεί. Μετά την εφαρμογή, οι μέλισσες τοποθετούνται μέσα σε κλωβούς όπου υπάρχουν διαλύματα γλυκόζης.

1.6.3.2 Διάρκεια

Η δοκιμασία διαρκεί κατά προτίμηση 48 h. Εάν στο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τις 24 μέχρι τις 48 ώρες η θνησιμότητα αυξηθεί κατά περισσότερο από 10 %, η διάρκεια της δοκιμασίας παρατείνεται μέχρι το πολύ 96 h, υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα ελέγχου δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

1.6.4 Παρατηρήσεις

Η θνησιμότητα καταγράφεται μετά παρέλευση 4 h, 24 h και 48 h από τη χορήγηση της εκάστοτε δόσης. Εάν χρειαστεί να παραταθεί η διάρκεια των παρατηρήσεων, πρέπει να συνεχιστούν οι αξιολογήσεις ανά 24 h, μέχρι το πολύ 96 h, υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα των μαρτύρων δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

Καταγράφεται κάθε είδους αφύσικη συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

1.6.5 Οριακή δοκιμασία

Σε ορισμένες περιπτώσεις (όταν για παράδειγμα μια δοκιμαζόμενη ουσία αναμένεται να είναι χαμηλής τοξικότητας), ενδέχεται να πραγματοποιηθεί μια οριακή δοκιμασία, με τη χρησιμοποίηση 100 μg δραστηκής ουσίας ανά μέλισσα για να αποδειχτεί ότι η τιμή της LD₅₀ είναι μεγαλύτερη από την τιμή αυτή. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται σε τρεις όμοιες ομάδες για την εκάστοτε δόση, τους αντίστοιχους μάρτυρες και την πρότυπη τοξική ουσία. Εάν σημειωθούν θάνατοι, θα πρέπει να γίνει πλήρης μελέτη. Εάν παρατηρηθούν επιπτώσεις σχεδόν θανατηφόρες (βλ. 1.6.4), πρέπει να καταγραφούν.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

2.1 ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφανίζονται, για κάθε ομάδα που εκτίθεται στη δοκιμαζόμενη ουσία, καθώς και για τις ομάδες των μαρτύρων και τις ομάδες που εκτίθενται στην πρότυπη τοξική ουσία, ο αριθμός των χρησιμοποιηθεισών μελισσών, η θνησιμότητα ανά χρονικό διάστημα παρατήρησης και ο αριθμός μελισσών με αφύσικη συμπεριφορά. Τα δεδομένα τα σχετικά με τη θνησιμότητα αναλύονται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους (π.χ. ανάλυση probit, κινητός μέσος, διωνυμική πιθανότητα) (3)(4). Χαράσσονται καμπύλες δόσης-απόκρισης για κάθε συνιστώμενη χρονική διάρκεια παρατήρησης (24 h και 48 h, ενδεχομένως δε 72 h και 96 h) και υπολογίζονται οι κλίσεις των καμπυλών και οι μέσες θανατηφόρες δόσεις (LD₅₀) με όριο εμπιστοσύνης 95 %. Με τη βοήθεια της διόρθωσης Abbott (4)(5), μπορούν να γίνουν διορθώσεις της θνησιμότητας των μαρτύρων. Η LD₅₀ πρέπει να εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα.

2.2 ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1 Δοκιμαζόμενη ουσία

- φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. σταθερότητα στο νερό, τάση ατμών).
- χημικά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων συντακτικός τύπος, καθαρότητα (προκειμένου για φυτοφάρμακα, ταυτότητα και συγκέντρωση των δραστικών ουσιών).

2.2.2 Χρησιμοποιηθέν είδος

- επιστημονικό όνομα, φυλή, ηλικία κατά προσέγγιση (σε εβδομάδες), τρόπος και ημερομηνία συλλογής.
- πληροφορίες για τις αποικίες από τις οποίες προέρχονται οι μέλισσες που χρησιμοποιήθηκαν στην υπόψη μελέτη (υγεία, τυχόν ασθένειες στα ενήλικα άτομα, τυχόν προηγούμενη αγωγή, κ.λπ.).

2.2.3 Συνθήκες της δοκιμασίας

- θερμοκρασία και σχετική υγρασία του πειραματικού χώρου.
- τύπος, μέγεθος και υλικό των κλωβών.
- πληροφορίες σχετικές με τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας (π.χ. διαλύτης/φορέας, όγκος διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για τοπική εφαρμογή, αναισθητικό).
- περιγραφή της δοκιμασίας σε γενικές γραμμές (πόσες και ποιες δόσεις χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός μαρτύρων, αριθμός κλωβών και μελισσών ανά κλωβό για κάθε δόση και ομάδα μαρτύρων).
- ημερομηνία της δοκιμασίας.

2.2.4 Αποτελέσματα

- αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικής μελέτης εντοπισμού εύρους τιμών.
- ακατέργαστα δεδομένα: θνησιμότητα για κάθε δόση και χρονική διάρκεια παρατήρησης.
- γραφικές παραστάσεις δόσης-απόκρισης στο τέλος της δοκιμασίας.
- τιμές LD₅₀ με όριο εμπιστοσύνης 95 % για κάθε χρονική διάρκεια παρατήρησης, ουσία και πρότυπη τοξική ουσία.
- στατιστικές μέθοδοι προσδιορισμού της LD₅₀.
- θνησιμότητα κατά τους ελέγχους.
- άλλες παρατηρήσεις ή μετρήσεις βιολογικών επιπτώσεων και κάθε αφύσικη συμπεριφορά των μελισσών.
- τυχόν παρέκκλιση από τις περιγραφόμενες εδώ διαδικασίες της δοκιμασίας και κάθε άλλη σχετική πληροφορία.

3.

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March, 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265-267.

C.18. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ/ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΚΑΤΑ ΠΑΡΤΙΔΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 106, για τον προσδιορισμό της προσρόφησης/εκρόφησης εδαφών με μέθοδο ισορροπίας κατά παρτίδα (2000).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη μέθοδο ελήφθη υπόψη κυκλική δοκιμή και συνάντηση ανταλλαγής απόψεων σχετικά με την επιλογή εδαφών για την ανάπτυξη δοκιμής προσρόφησης (1)(2)(3)(4) καθώς επίσης και υφιστάμενες κατευθυντήριες γραμμές σε εθνικό επίπεδο (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Οι μελέτες προσρόφησης/εκρόφησης είναι χρήσιμες για τη λήψη βασικών πληροφοριών για την κινητικότητα των χημικών ουσιών και την κατανομή τους στο έδαφος, το νερό και τα αέρια στρώματα της βιόσφαιρας (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). Οι πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόβλεψη ή εκτίμηση, π.χ., της διαθεσιμότητας μιας χημικής ουσίας προς αποικοδόμηση (22)(23), μετασχηματισμό και πρόσληψή της από οργανισμούς (24), της απόπλυσής της διαμέσου των εδαφικών στρωμάτων (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28), της πτητικότητάς της από το έδαφος (21)(29)(30) και της απορροής της από χερσαίες επιφάνειες σε φυσικά ύδατα (18)(31)(32). Τα δεδομένα προσρόφησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για συγκριτικούς και προτυποποιητικούς σκοπούς (19)(33)(34)(35).

Η κατανομή μιας χημικής ουσίας μεταξύ εδάφους και υδατικών φάσεων αποτελεί μία πολύπλοκη διεργασία που εξαρτάται από διάφορους παράγοντες: τη χημική φύση της ουσίας (12)(36)(37)(38)(39)(40), τα χαρακτηριστικά του εδάφους (4)(12)(13)(14)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49) και κλιματικούς παράγοντες όπως οι βροχοπτώσεις, η θερμοκρασία, το φως του ήλιου και ο άνεμος. Έτσι, τα πολυάριθμα φαινόμενα και μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διεργασία της προσρόφησης μιας χημικής ουσίας στο έδαφος δεν μπορούν να οριστούν πλήρως από ένα απλοποιημένο εργαστηριακό μοντέλο όπως η παρούσα μέθοδος. Εντούτοις, έστω κι αν η παρούσα προσπάθεια δεν μπορεί να καλύψει όλες τις περιβαλλοντικές πιθανές περιπτώσεις, προσφέρει επαρκείς πληροφορίες για τη σημασία σε σχέση με το περιβάλλον της προσρόφησης μιας χημικής ουσίας.

Βλ. επίσης Γενική Εισαγωγή.

1.2 ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος αποσκοπεί στην εκτίμηση της συμπεριφοράς μιας χημικής ουσίας από πλευράς προσρόφησης/εκρόφησης στο έδαφος. Στόχος είναι να ληφθεί μία τιμή ρόφησης που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην πρόβλεψη της κατανομής σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίζονται συντελεστές προσρόφησης σε ισορροπία για μια χημική ουσία σε διάφορα εδάφη σε συνάρτηση με τα εδαφικά χαρακτηριστικά (π.χ. περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, περιεκτικότητα σε άργιλο και υφή και το pH του εδάφους). Για να καλυφθούν όσο το δυνατό καλύτερα οι αλληλεπιδράσεις μιας δεδομένης ουσίας με φυσικώς απαντώμενα εδάφη, πρέπει να χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι εδαφών.

Στην παρούσα μέθοδο, η προσρόφηση αντιπροσωπεύει τη διεργασία της σύνδεσης μιας χημικής ουσίας με επιφάνειες εδαφών. Δεν γίνεται διάκριση μεταξύ διαφορετικών διεργασιών προσρόφησης (φυσική και χημική προσρόφηση) και διεργασιών όπως η επιφανειακά καταλύσιμη αποικοδόμηση, η κατά μάζα προσρόφηση ή η χημική αντίδραση. Προσρόφηση η οποία απαντάται σε κolloειδή σωματίδια (διάμετρος < 0.2 μm) δημιουργούμενα από το έδαφος δεν λαμβάνεται υπόψη.

Οι εδαφικές παράμετροι που πιστεύεται ότι παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην προσρόφηση είναι: η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48), η περιεκτικότητα σε άργιλο και η υφή του εδάφους (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48) και το pH για τις ιονιζόμενες ενώσεις (3)(4)(42). Άλλες εδαφικές παράμετροι οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την προσροφήση/εκροφήση μιας συγκεκριμένης ουσίας είναι, η ενεργός κατιονταλλακτική ικανότητα (ECEC), η περιεκτικότητα σε άμορφα οξείδια σιδήρου και αργιλίου, ιδιαίτερα για ηφαιστειακά και τροπικά εδάφη (4), καθώς επίσης και η ειδική επιφάνεια (49).

Η δοκιμή έχει σχεδιαστεί για την εκτίμηση της προσρόφησης μιας χημικής ουσίας σε διάφορους τύπους εδαφών με ποικίλη περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, άργιλο και εδαφική υφή και pH. Περιλαμβάνει τρία μέρη:

Μέρος 1: Προκαταρκτική μελέτη για να προσδιοριστούν:

- ο λόγος εδάφους/διάλυμα,
- ο χρόνος ισορροπίας για την προσρόφηση και η προσροφημένη ουσία κατά την ισορροπία,
- η προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων και η σταθερότητά της κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Μέρος 2: Δοκιμή προσανατολισμού: μελετάται η προσρόφηση σε πέντε διαφορετικούς τύπους εδαφών μέσω της κινητικής της προσροφήσεως σε μία μόνη συγκέντρωση και προσδιορισμού των συντελεστών κατανομής K_d και K_{oc} .

Μέρος 3: Προσδιορισμός των ισοθέμων προσρόφησης Freundlich για τον προσδιορισμό της επίδρασης της συγκέντρωσης στην έκταση της προσρόφησης στα εδάφη.

Μελέτη της εκρόφησης μέσω της κινητικής εκρόφησης/ισοθέμων εκρόφησης Freundlich (Παράρτημα 1).

1.3

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Σύμβολο	Ορισμός	Μονάδες
A_{t_i}	ποσοστιαία προσρόφηση τη χρονική στιγμή t_i	%
A_{eq}	ποσοστιαία προσρόφηση στην κατάσταση ισορροπίας	%
$m_s^{ads}(t_i)$	μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας τη χρονική στιγμή t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας στην κατάσταση ισορροπίας	μg
m_0	μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοκιμαστικό σωλήνα στην αρχή της δοκιμής προσρόφησης	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	μάζα της υπό δοκιμή ουσίας ανευρισκόμενη σε ποσότητα (v_a^A) τη χρονική στιγμή t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	μάζα της ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης	μg
m_{soil}	ποσότητα της εδαφικής φάσης, εκφραζόμενη σε ξηρή μάζα εδάφους	g
C_{st}	κ.ο. συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος της ουσίας	μg cm ⁻³
C_0	αρχική κ.ο. συγκέντρωση του υπό δοκιμή διαλύματος σε επαφή με το έδαφος	μg cm ⁻³
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	κ.ο. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση τη χρονική στιγμή t_i της ανάλυσης	μg cm ⁻³

$C_s^{ads}(eq)$	συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας στο έδαφος στην κατάσταση ισορροπίας	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	κ.ο. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	αρχικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος κατά τη διάρκεια της δοκιμής προσρόφησης	cm^3
v_a^A	όγκος της ποσότητας στην οποία μετράται η υπό δοκιμή ουσία	cm^3
K_d	συντελεστής κατανομής για την προσρόφηση	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{oc}	τυποποιημένος συντελεστής προσρόφησης οργανικού άνθρακα	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{om}	τυποποιημένος συντελεστής κατανομής οργανικής ύλης	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	συντελεστής προσρόφησης Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	εκθέτης Freundlich	
D_{t_i}	ποσοστιαία εκρόφιση τη χρονική στιγμή t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	ποσοστιαία εκρόφιση κατά το χρονικό διάστημα Δt_i	%
K_{des}	φαινομενικός συντελεστής εκρόφησης	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{des}	συντελεστής εκρόφησης Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	μάζα της εκροφημένης από το έδαφος υπό δοκιμή ουσίας κατά το χρόνο t_i	μg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που εκροφάται από το έδαφος κατά τη διάρκεια του χρόνου Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	μάζα της ουσίας που προσδιορίζεται αναλυτικώς στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	συνολική μάζα της εκροφημένης υπό δοκιμή ουσίας σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	μάζα της ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος μετά τη χρονική περίοδο Δt_i	μg
m_{aq}^A	μάζα της ουσίας που περισεύει μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης λόγω μη πλήρους κατ' όγκο αντικατάστασης	μg
$C_s^{des}(eq)$	συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος στην κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des}(eq)$	κ.ο. συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_T	συνολικός όγκος της σε επαφή με το έδαφος υδατικής φάσης κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής της εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά μέθοδο	cm^3
V_R	όγκος του υπερκειμένου υγρού που απομακρύνεται από το σωλήνα μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται από ίσο όγκο διαλύματος 0.01 M CaCl_2	cm^3
v_a^D	όγκος της ποσότητας που δειγματοβιβάζεται για αναλυτικούς σκοπούς από τη χρονική στιγμή (i), κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά δοκιμή	cm^3
V_r^i	όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα (i) για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε πείραμα κινητικής εκρόφησης (παράλληλη μέθοδος)	cm^3

V_F	όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	cm^3
MB	υπόλοιπο μάζας	%
m_E	συνολική μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που εκχυλίζεται από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοχείου δοκιμής σε δύο στάδια	μg
V_{rec}	όγκος του υπερκειμένου υγρού που ανακτάται μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης (cm^3)	cm^3
P_{ow}	συντελεστής κατανομής σε οκτανόλη/νερό	
P_{ka}	σταθερά διαστάσεως	-
S_w	υδατοδιαλυτότητα	g l^{-1}

1.4 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Γνωστοί όγκοι διαλυμάτων της υπό δοκιμή ουσίας, ραδιοϊχνηθετημένης ή μη, σε γνωστές συγκεντρώσεις σε 0.01 M CaCl_2 προστίθενται σε δείγματα εδαφών γνωστού ξηρού βάρους που έχουν προηγουμένως σταθεροποιηθεί σε 0.01 M CaCl_2 . Το μίγμα αναδεύεται για κατάλληλο χρονικό διάστημα. Τα εδαφικά εναιωρήματα διαχωρίζονται κατόπιν με φυγοκέντρηση και, εφόσον επιθυμείται, διήθηση και η υδατική φάση αναλύεται. Η ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας που προσροφάται στο εδαφικό δείγμα υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ της ποσότητας της υπό δοκιμή ουσίας που υπήρχε αρχικά στο διάλυμα και της ποσότητας που παραμένει στο τέλος του πειράματος (έμμεση μέθοδος).

Εναλλακτικώς, η ποσότητα της προσροφουμένης υπό δοκιμή ουσίας μπορεί επίσης να προσδιοριστεί απευθείας με ανάλυση του εδάφους (άμεση μέθοδος). Η διαδικασία αυτή, η οποία συνίσταται σε σταδιακή εκχύλιση του εδάφους με κατάλληλο διαλύτη, συνίσταται σε περιπτώσεις όπου η διαφορά στη συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα δεν μπορεί να προσδιοριστεί επακριβώς. Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι: προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνεια των δοκιμαστικών σωλήνων, αστάθεια της υπό δοκιμή ουσίας στη χρονική κλίμακα του πειράματος, ασθενής προσρόφηση που επιφέρει μικρές μόνο μεταβολές συγκεντρώσεως στο διάλυμα και ισχυρή προσρόφηση που απολήγει σε χαμηλή συγκέντρωση που δεν μπορεί να προσδιοριστεί επακριβώς. Εφόσον χρησιμοποιείται ραδιοϊχνηθετημένη ουσία, η εκχύλιση του εδάφους μπορεί να αποφευχθεί με ανάλυση της εδαφικής φάσης μέσω καύσης και καταμέτρησης υγρού σπινθηρισμού. Εντούτοις, η καταμέτρηση υγρού σπινθηρισμού είναι μία μη εξειδικευμένη τεχνική που δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ αρχικών και προϊόντων μετασχηματισμού. Συνεπώς, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνον εφόσον η υπό δοκιμή ουσία είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της μελέτης.

1.5 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια θα πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας. Συνιστάται η χρήση μη ιχνηθετημένων υπό δοκιμή ουσιών με γνωστή σύσταση και, κατά προτίμηση, 95% τουλάχιστον βαθμό καθαρότητας ή ραδιοϊχνηθετημένων υπό δοκιμή ουσιών με γνωστή σύσταση και ραδιοκαθαρότητα. Στην περίπτωση ιχνηθετών βραχείας ημιζωής, θα πρέπει να γίνονται διορθώσεις σχετικά με τη διάσπαση.

Πριν από την εκτέλεση μιας δοκιμής προσρόφησης-εκρόφησης, θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα τα εξής στοιχεία για την υπό δοκιμή ουσία:

- Υδατοδιαλυτότητα (Α.6.)
- Τάση ατμών (Α.4.) και/ή σταθερά του νόμου του Henry
- Αβιοτική αποικοδόμηση: Υδρόλυση σε συνάρτηση με το pH (C.7.)
- Συντελεστής κατανομής (Α.8.)
- ?Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (C.4.) ή αερόβιος και αναερόβιος μετασχηματισμός στο έδαφος
- pK_a ιοντίσμων ουσιών
- ?Άμεση φωτόλυση στο νερό (δηλ. φάσμα απορρόφησης UV-Ορατού στο νερό, Κβαντοαπόδοση) και φωτοαποικοδόμηση στο έδαφος.

1.6 ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί σε χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχει αναλυτική μέθοδος με επαρκή ορθότητα (accuracy). Μία σημαντική παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, ειδικά όταν ακολουθείται η έμμεση μέθοδος, είναι η σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στη χρονοκλίμακα της δοκιμής. Έτσι, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της σταθερότητας με μια προκαταρκτική δοκιμή. Εφόσον παρατηρηθεί μετασχηματισμός στη χρονοκλίμακα της δοκιμής, συνιστάται η κύρια μελέτη να πραγματοποιείται με ανάλυση τόσο της εδαφικής όσο και των υδατικών φάσεων.

Κατά τη διεξαγωγή αυτής της δοκιμής, είναι δυνατόν να προκύψουν δυσκολίες για ουσίες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), καθώς επίσης και για ουσίες με υψηλό φορτίο, λόγω του ότι η συγκέντρωση στην υδατική φάση δεν μπορεί να μετρηθεί αναλυτικά με επαρκή ορθότητα. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να λαμβάνονται πρόσθετα μέτρα. Οδηγίες για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών παρέχονται στα σχετικά κεφάλαια της παρούσας μεθόδου.

Κατά τη δοκιμή πτητικών ουσιών, θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια για την αποφυγή απωλειών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής.

1.7 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.7.1 Όργανα και χημικά αντιδραστήρια

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και ειδικότερα τα εξής:

- a) Σωλήνες ή δοχεία για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Είναι σημαντικό οι σωλήνες αυτοί ή δοχεία:
 - να ταιριάζουν απόλυτα στη φυγοκεντρική συσκευή για την ελαχιστοποίηση σφαλμάτων χειρισμού ή μεταφοράς,
 - να είναι από αδρανές υλικό, ώστε να ελαχιστοποιείται η προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνειά τους.
- b) Συσκευή αναδέυσεως: overhead αναμεικτής ή ισοδύναμος εξοπλισμός. Η συσκευή αναδέυσεως θα πρέπει να διατηρεί το έδαφος εν αιωρήσει κατά τη διάρκεια της ανακίνησης.
- c) Φυγόκεντρος: κατά προτίμηση υψηλής ταχύτητας, π.χ. ταχύτητα φυγοκέντρωσης $> 3000\text{g}$, ελεγχόμενης θερμοκρασίας και δυνάμενη να απομακρύνει σωματίδια με διάμετρο μεγαλύτερη από $0.2 \mu\text{m}$ από υδατικό διάλυμα. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι καλυμμένα κατά τη διάρκεια της ανάδευσης και φυγοκέντρωσης για να αποφεύγονται απώλειες πτητικών συστατικών και νερού. Για την ελαχιστοποίηση της προσρόφησης σε αυτά, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται απενεργοποιημένα καλύμματα όπως βιδωτά πώματα επενδεδυμένα με τεφλόν.
- d) Προαιρετικό: διάταξη διηθήσεως: φίλτρα με πορώδες $0.2 \mu\text{m}$, αποστειρωμένα, μιας χρήσεως. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στην επιλογή του υλικού του φίλτρου για να αποφεύγονται τυχόν απώλειες της υπό δοκιμή ουσίας σε αυτό. Στην περίπτωση ουσιών χαμηλής διαλυτότητας, συνιστάται η χρήση φίλτρων από οργανικό υλικό.
- e) Αναλυτικά όργανα, κατάλληλα για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας.
- f) Εργαστηριακός κλίβανος με δυνατότητα διατήρησης της θερμοκρασίας στην περιοχή των $103 \text{ }^\circ\text{C}$ έως $110 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.7.2 Χαρακτηρισμός και επιλογή εδαφών

Τα εδάφη θα πρέπει να χαρακτηρίζονται με βάση τρεις παραμέτρους που θεωρούνται ως οι βασικοί παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η προσροφητική ικανότητα: την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, την περιεκτικότητα σε άργιλο και υφή του εδάφους και το pH. Όπως αναφέρθηκε ήδη (βλ. πεδίο εφαρμογής), ρόλο στην προσρόφηση/εκρόφηση μιας συγκεκριμένης ουσίας μπορεί να παίζουν και άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους οι οποίες και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στις περιπτώσεις αυτές.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό των εδαφών παίζουν σπουδαίο ρόλο και μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στα αποτελέσματα. Συνιστάται λοιπόν το pH του εδάφους να μετρείται σε διάλυμα 0.01 M CaCl₂ (δηλ. το διάλυμα που χρησιμοποιείται στη δοκιμή προσρόφησης/εκρόφησης) σύμφωνα με την αντίστοιχη μέθοδο ISO (ISO-10390-1). Συνιστάται επίσης και οι υπόλοιπες σχετικές εδαφικές ιδιότητες να προσδιορίζονται σύμφωνα με τυποποιημένες μεθόδους (Εγχειρίδιο ανάλυσης εδαφών ISO). Με τον τρόπο αυτό η ανάλυση των δεδομένων ρόφησης βασίζεται σε διεθνώς τυποποιημένες εδαφικές παραμέτρους. Ορισμένες οδηγίες για τις υφιστάμενες τυποποιημένες μεθόδους ανάλυσης και χαρακτηρισμού εδαφών περιλαμβάνονται στις παραπομπές (50-52). Για τη διακρίβωση των μεθόδων δοκιμής εδαφών, συνιστάται η χρήση εδαφών αναφοράς.

Οδηγίες για την επιλογή εδαφών για δοκιμές προσρόφησης/εκρόφησης δίνονται στον πίνακα 1. Τα επτά επιλεγόμενα εδάφη καλύπτουν τύπους εδαφών που απαντώνται σε εύκρατες γεωγραφικές ζώνες. Στην περίπτωση ιονισίμων προς δοκιμή ουσιών, τα επιλεγόμενα εδάφη θα πρέπει να καλύπτουν μία μεγάλη περιοχή pH, για να μπορεί να εκτιμηθεί η προσρόφηση της ουσίας στην ιονισμένη και μη ιονισμένη μορφή της. Οδηγίες σχετικά με το πόσα διαφορετικά εδάφη πρέπει να χρησιμοποιούνται στα διάφορα στάδια της δοκιμής δίνονται στο 1.9 “Εκτέλεση της δοκιμής”.

Εφόσον προτιμηθούν άλλοι τύποι εδαφών, αυτά θα πρέπει να χαρακτηρίζονται με τις ίδιες παραμέτρους και οι ιδιότητές τους να εμπίπτουν στις ίδιες περιοχές με εκείνες που περιγράφονται στον πίνακα 1, έτσι κι αν δεν πληρούν απολύτως τα κριτήρια.

Πίνακας 1: Οδηγίες επιλογής εδαφικών δειγμάτων για δοκιμές προσρόφησης- εκρόφησης

Τύπος εδάφους	Περιοχή pH (σε 0.01 M CaCl ₂)	Περιεκτικότητα σε οργ. άνθρακα (%)	Περιεκτικότητα σε άργιλο (%)	Υφή εδάφους*
1	4.5 - 5.5	1.0 - 2.0	65 - 80	άργιλος
2	> 7.5	3.5 - 5.0	20 - 40	αργιλώδης πηλός
3	5.5 - 7.0	1.5 - 3.0	15 - 25	προσχωσιγενής άργιλος
4	4.0 - 5.5	3.0 - 4.0	15 - 30	πηλός
5	< 4.0 - 6.0 [§]	< 0.5 - 1.5 [‡]	< 10 - 15 [§]	αργιλώδης άμμος
6	> 7.0	< 0.5 - 1.0 [‡]	40 - 65	αργιλοπηλός/ άργιλος
7	< 4.5	> 10	< 10	άμμος/ αργιλώδης άμμος

* Σύμφωνα με το σύστημα FAO και το αμερικανικό σύστημα (85).

§ Οι αντίστοιχες μεταβλητές θα πρέπει, κατά προτίμηση, να έχουν τιμές μέσα στην προβλεπόμενη περιοχή. Εάν, εντούτοις, συναντώνται δυσκολίες στην ανεύρεση κατάλληλων εδαφών, είναι αποδεκτές και τιμές κάτω της υποδεικνυόμενης ελάχιστης τιμής.

‡ Εδάφη με λιγότερο από 0.3% οργανικό άνθρακα μπορεί να διαταράξουν τη σχέση μεταξύ περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα και προσρόφησης. Συνιστάται λοιπόν η χρήση εδαφών με περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα τουλάχιστον 0.3%.

1.7.3 Συλλογή και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων

1.7.3.1 Συλλογή

Δεν χρειάζονται εξειδικευμένες τεχνικές ή σύνεργα δειγματοληψίας. Η τεχνική δειγματοληψίας εξαρτάται από το σκοπό της μελέτης (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα:

- α) απαιτούνται λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό του εδαφικού πεδίου συμπεριλαμβανομένης της τοποθεσίας, της βλάστησης, των χρήσεων γεωργικών φαρμάκων και/ή λιπασμάτων, βιολογικών προσθηκών ή τυχαίας μόλυνσης. Για την περιγραφή του τόπου δειγματοληψίας θα πρέπει να ακολουθούνται οι συστάσεις του προτύπου του ISO για τη δειγματοληψία εδαφών (ISO 10381-6),

- b) ο τόπος δειγματοληψίας πρέπει να ορίζεται με UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ή γεωγραφικές συντεταγμένες. Αυτό δίνει τη δυνατότητα επανασυλλογής ενός συγκεκριμένου εδάφους στο μέλλον ή μπορεί να βοηθήσει στο ορισμό του εδάφους με βάση διάφορα συστήματα ταξινόμησης που χρησιμοποιούνται σε διάφορες χώρες. Επίσης, θα πρέπει να συλλέγεται μόνον ορίζοντας A μέχρι μέγιστο βάθος 20 cm. Ειδικά στην περίπτωση του εδάφους αριθ.7, εφόσον ως τμήμα του εδάφους υπάρχει ορίζοντας O_h , αυτός θα πρέπει να περιλαμβάνεται στη δειγματοληψία.

Τα δείγματα των εδαφών θα πρέπει να μεταφέρονται με περιέκτες και υπό συνθήκες θερμοκρασίας που να εγγυώνται ότι οι αρχικές ιδιότητες του εδάφους δεν πρόκειται να αλλοιωθούν σημαντικά.

1.7.3.2 *Αποθήκευση*

Προτιμάται η χρήση προσφάτως ληφθέντων εδαφών. Μόνον εφόσον αυτό δεν είναι δυνατό, τότε τα εδάφη θα πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και να διατηρούνται ξηραίνόμενα στον αέρα. Δεν προβλέπεται κάποιο χρονικό όριο στην αποθήκευση, τα εδάφη όμως που αποθηκεύονται για διάστημα μεγαλύτερο των τριών χρόνων θα πρέπει να επανυποβάλλονται, πριν χρησιμοποιηθούν, σε ανάλυση ως προς την περιεκτικότητά τους σε οργανικό άνθρακα, το pH και τη CEC.

1.7.3.3 *Χειρισμός και προετοιμασία εδαφικών δειγμάτων για τη δοκιμή*

Τα εδάφη ξηραίνονται στον αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (κατά προτίμηση μεταξύ 20-25 °C). Τυχόν αποσυσσωμάτωση θα πρέπει να πραγματοποιείται με την ελάχιστη δυνατή δύναμη, έτσι ώστε η αρχική υφή του εδάφους να παραμένει κατά το δυνατόν αναλλοίωτη. Τα εδάφη κοσκινίζονται μέχρι μεγέθους σωματιδίων ≤ 2 mm. Για το κοσκίνισμα, θα πρέπει να ακολουθούνται οι συστάσεις του προτύπου ISO για τη δειγματοληψία εδαφών (ISO 10381-6). Συνιστάται προσεκτική ομοιογενοποίηση, καθώς έτσι ενισχύεται η αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων. Η υγρασία κάθε εδάφους προσδιορίζεται σε τρία δείγματα με θέρμανση στους 105 °C μέχρις ότου να μην υπάρχει καμία σημαντική μεταβολή στο βάρος (περ. 12h). Για όλους τους υπολογισμούς η μάζα του εδάφους αναφέρεται σε ξηρά εκ κλιβάνου μάζα δηλ. το βάρος του εδάφους διορθωμένο ως προς την υγρασία.

1.7.4 **Προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας για προσθήκη στο έδαφος**

Η υπό δοκιμή ουσία διαλύεται σε διάλυμα 0.01 M $CaCl_2$ σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Το διάλυμα $CaCl_2$ χρησιμοποιείται ως η φάση υδατικού διαλύτη για τη βελτίωση της φυγοκέντρωσης και την ελαχιστοποίηση της κατιον ανταλλαγής. Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι τρεις τάξεις μεγέθους υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου. Το ελάχιστο αυτό όριο διασφαλίζει την πραγματοποίηση επακριβών μετρήσεων σε σχέση με τη μεθοδολογία που ακολουθείται σε αυτή τη μέθοδο. Επιπλέον, η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος θα πρέπει να είναι μικρότερη από την υδατοδιαλυτότητα της υπό δοκιμή ουσίας.

Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται λίγο πριν από την προσθήκη του σε εδαφικά δείγματα και να διατηρείται κλειστό στο σκότος στους 4 °C. Ο χρόνος αποθήκευσης εξαρτάται από τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας και τη συγκέντρωσή της στο διάλυμα.

Αποκλειστικά στην περίπτωση ασθενώς διαλυτών ουσιών ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), μπορεί να χρειάζεται ένας κατάλληλος διαλυτοποιητικός παράγοντας όταν η υπό δοκιμή ουσία είναι δύσκολο να διαλυθεί. Ο διαλυτοποιητικός αυτός παράγοντας: (α) θα πρέπει να αναμειγνύεται με νερό όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο, (β) η συγκέντρωσή του δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1% του συνολικού όγκου του αρχικού διαλύματος, ενώ θα πρέπει να είναι μικρότερη από αυτή στο διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας που θα έλθει σε επαφή με το έδαφος (κατά προτίμηση, μικρότερη του 0,1%) και (γ) δεν θα πρέπει να είναι τασενεργός ή να υφίσταται διαλυτολυτικές αντιδράσεις με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εφόσον χρησιμοποιείται διαλυτοποιητικός παράγοντας, αυτό θα πρέπει να προσδιορίζεται και να αιτιολογείται στην αναφορά των στοιχείων.

Μια άλλη εναλλακτική λύση για τις ασθενώς διαλυτές ουσίες είναι η προσθήκη της υπό δοκιμή ουσίας στο υπό δοκιμή σύστημα μέσω οργανικού διαλύτη: η υπό δοκιμή ουσία διαλύεται σε οργανικό διαλύτη και ποσότητα αυτού προστίθεται στο σύστημα εδάφους και διαλύματος 0,01 M CaCl₂ σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Η περιεκτικότητα του οργανικού διαλύτη στην υδατική φάση θα πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατό χαμηλότερη, χωρίς να υπερβαίνει κανονικά το 0.1%. Η προσθήκη μέσω οργανικού διαλύματος μπορεί να παρουσιάζει αδυναμία στο θέμα της ογκομετρικής επαναληψιμότητας. Έτσι, μπορεί να εισαχθεί ένα πρόσθετο σφάλμα καθώς η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας και του συνδιαλύτη μπορεί να μην είναι η ίδια σε όλες τις δοκιμές.

1.8 ΠΡΟΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ/ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ

1.8.1 Αναλυτική μέθοδος

Στις βασικές παραμέτρους που μπορεί να επηρεάσουν την ορθότητα των μετρήσεων ρόφησης περιλαμβάνονται η ορθότητα της αναλυτικής μεθόδου στην ανάλυση τόσο του διαλύματος όσο και των προσροφημένων φάσεων, η σταθερότητα και καθαρότητα της υπό δοκιμή ουσίας, η επίτευξη ισορροπίας ρόφησης, το μέγεθος της μεταβολής της συγκέντρωσης του διαλύματος, ο λόγος εδάφους/διάλυμα και οι μεταβολές στη δομή του εδάφους κατά τη διάρκεια της διεργασίας αποκατάστασης ισορροπίας (35)(59-62). Μερικά παραδείγματα σχετικά με θέματα ορθότητας δίδονται στο παράρτημα 2.

Η αξιοπιστία της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου πρέπει να εξελέγχεται στην περιοχή συγκεντρώσεων που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Ο πειραματιζόμενος θα πρέπει να έχει την ελευθερία ανάπτυξης κατάλληλης μεθόδου με την κατάλληλη ορθότητα, ακρίβεια, αναπαραγωγιμότητα, όρια ανίχνευσης και ανάκτηση. Οδηγίες για την εκτέλεση της δοκιμής δίδονται στο πείραμα που περιγράφεται παρακάτω.

Κατάλληλος όγκος διαλύματος 0.01 M CaCl₂, π.χ. 100 cm³, αναδεύεται για 4 h με ποσότητα εδάφους, π.χ. 20 g, υψηλής προσροφησιμότητας, δηλ. με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και άργιλο. Οι τιμές αυτές βαρών και όγκων μπορούν να διαφοροποιούνται ανάλογα με τις αναλυτικές ανάγκες, ένα όμως πρόσφορο σημείο εκκίνησης είναι ένας λόγος εδάφους/διάλυμα 1:5. Το μίγμα φυγοκεντρείται και η υδατική φάση μπορεί να διηθηθεί. Στην τελευταία προστίθεται ορισμένος όγκος του αρχικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας ώστε να επιτευχθεί ονομαστική συγκέντρωση στα πλαίσια της περιοχής συγκεντρώσεων που έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Ο όγκος αυτός δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10% του τελικού όγκου της υδατικής φάσης έτσι ώστε η μεταβολή στη φύση του προ της αποκατάστασης ισορροπίας διαλύματος να είναι όσο το δυνατό μικρότερη. Το διάλυμα υποβάλλεται σε ανάλυση.

Στην όλη διαδικασία πρέπει να περιλαμβάνεται και η ανάλυση τυφλού δείγματος αποτελούμενο από σύστημα εδάφους + διαλύματος CaCl₂ (χωρίς υπό δοκιμή ουσία) για να ελέγχεται η τυχόν ύπαρξη τεχνικών σφαλμάτων στην αναλυτική μέθοδο ή παρενεργειών από το έδαφος.

Στις αναλυτικές μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις ροφήσεως περιλαμβάνονται η χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η φασματομετρία (π.χ. φασματομετρία GC/μάζας, φασματομετρία HPLC/μάζας) και η καταμέτρηση σπινθηρισμού σε υγρό (για ραδιοεπισημασμένες ουσίες μόνο). Ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο, ως κατάλληλα ποσοστά ανακτήσεως θεωρούνται ποσοστά μεταξύ 90% και 110% της ονομαστικής τιμής. Για να μπορεί να γίνει ανίχνευση και αξιολόγηση μετά την κατανομή, τα όρια ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους κάτω της ονομαστικής συγκεντρώσεως.

Τα χαρακτηριστικά και τα όρια ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου που διατίθεται για την εκτέλεση των μελετών προσρόφησης παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής και την όλη πειραματική εκτέλεση της δοκιμής. Η μέθοδος αυτή ακολουθεί μια γενική πειραματική οδό και αποτελεί πηγή καθοδήγησης και κατευθύνσεων για εφαρμογή εναλλακτικών λύσεων αν τυχόν η αναλυτική μέθοδος και οι εργαστηριακές εγκαταστάσεις επιβάλλουν κάποιους περιορισμούς.

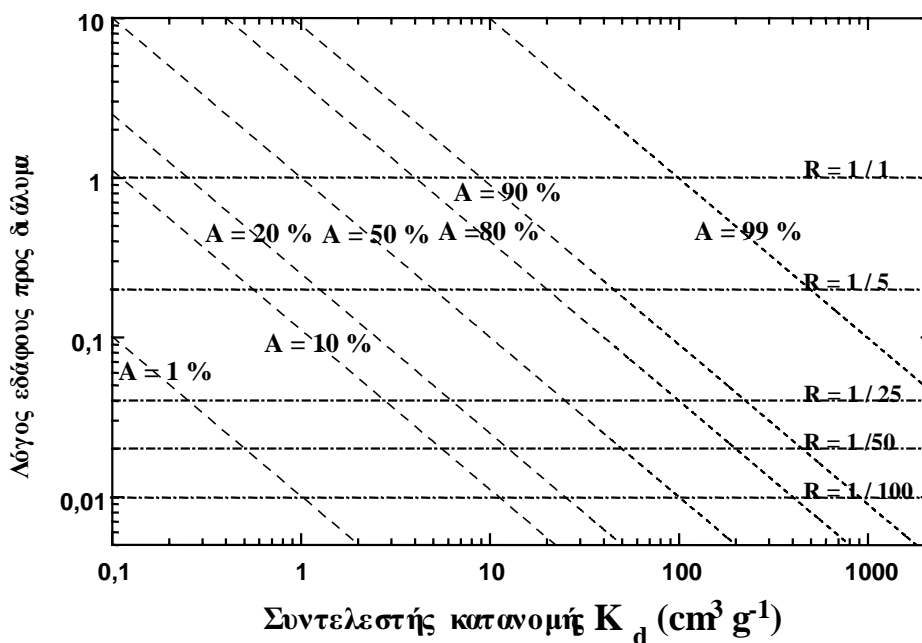
Η επιλογή των κατάλληλων λόγων εδάφους προς διάλυμα στις μελέτες προσρόφησης εξαρτάται από το συντελεστή κατανομής K_d και το σχετικό επιθυμητό βαθμό προσρόφησης. Η μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα καθορίζει τη στατιστική ορθότητα της μέτρησης με βάση τη μορφή της εξίσωσης προσρόφησης και το όριο της αναλυτικής μεθοδολογίας, στην ανίχνευση της συγκέντρωσης της διαλελυμένης χημικής ουσίας. Συνεπώς, στην πράξη, είναι χρήσιμο να καθορίζονται μερικοί πάγιοι λόγοι στους οποίους το προσροφούμενο ποσοστό να είναι πάνω από 20% και, κατά προτίμηση, >50% (62), ενώ ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται ώστε η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση να διατηρείται αρκετά υψηλή για να λαμβάνονται ορθές μετρήσεις. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση υψηλών ποσοστών προσρόφησης.

Μια πρόσφορη προσέγγιση στην επιλογή των κατάλληλων λόγων εδάφους/νερό βασίζεται στον υπολογισμό της τιμής K_d είτε με προκαταρκτικές μελέτες είτε με καθιερωμένες τεχνικές εκτίμησης (παράρτημα 3). Κατόπιν, μπορεί να γίνει επιλογή του κατάλληλου λόγου με βάση την καμπύλη των λόγων εδάφους/διάλυμα συναρτήσει των K_d για συγκεκριμένα ποσοστά προσρόφησης (εικ. 1). Στην γραφική αυτή παράσταση υποτίθεται ότι η εξίσωση προσρόφησης είναι γραμμική¹. Η προς εφαρμογή σχέση λαμβάνεται με αναδιασκευή της εξίσωσης (4) του K_d στη μορφή της εξίσωσης (1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

ή στη λογαριθμική της μορφή όπου $R = m_{\text{soil}}/V_0$ και $A_{\text{eq}}\%/100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$:

$$\log R = - \log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1-A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (2)$$



Εικ.1 Σχέση μεταξύ λόγων εδάφους προς διάλυμα και τιμών K_d για διάφορα ποσοστά προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας

¹ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

Στην εικ. 1 εμφανίζονται οι λόγοι εδάφους/διάλυμα σε συνάρτηση με τις τιμές K_d για διάφορα επίπεδα προσρόφησης. Για παράδειγμα, με λόγο εδάφους/διάλυμα 1:5 και τιμή $K_d=20$, η προσρόφηση ανέρχεται περίπου στο 80%. Για την επίτευξη προσρόφησης 50% με τον ίδιο K_d , πρέπει να χρησιμοποιηθεί λόγος 1:25. Η προσέγγιση αυτή για την επιλογή των κατάλληλων λόγων εδάφους/διάλυμα παρέχει στον ερευνητή άνεση στην αντιμετώπιση των διαφόρων πειραματικών αναγκών.

Οι περιπτώσεις που είναι δυσκολότερο να αντιμετωπιστούν είναι εκείνες όπου η ουσία προσροφάται σε υψηλό ή πολύ χαμηλό βαθμό. Όταν η προσρόφηση είναι χαμηλή, συνιστάται λόγος εδάφους/διάλυμα 1:1, αν και στην περίπτωση ορισμένων πολύ οργανικών εδαφικών τύπων μπορεί να χρειάζονται μικρότεροι λόγοι για τη λήψη υδαρούς αιωρήματος. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε με την αναλυτική μεθοδολογία να μετρώνται μικρές μεταβολές στη συγκέντρωση του διαλύματος. Διαφορετικά, η μέτρηση προσροφήσεως δεν θα είναι ακριβής. Από την άλλη μεριά, στην περίπτωση πολύ υψηλών συντελεστών κατανομής K_d , μπορεί να φθάσουμε σε τιμές λόγου 1:100 εδάφους/διάλυμα για να παραμείνει σημαντική ποσότητα ουσίας στο διάλυμα. Εντούτοις, πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να διασφαλίζεται καλή ανάμιξη, να αφήνεται δε ικανός χρόνος για την αποκατάσταση ισορροπίας στο σύστημα. Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι να προβλεφθεί η τιμή K_d εφαρμόζοντας τεχνικές εκτίμησης που βασίζονται, π.χ., στις τιμές P_{ow} (παράρτημα 3). Η προσέγγιση αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για πολικές ουσίες χαμηλής προσρόφησης με $P_{ow} < 20$ και υψηλής ροφησιμότητας λιποφίλες ουσίες με $P_{ow} > 10^4$.

1.9 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.9.1 Συνθήκες δοκιμής

Όλα τα πειράματα γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και, εφόσον είναι δυνατό, σε σταθερή θερμοκρασία μεταξύ 20 °C και 25 °C.

Με τις εφαρμοζόμενες συνθήκες φυγοκέντρωσης θα πρέπει να μπορούν να απομακρύνονται από το διάλυμα σωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερο από 0.2 μm . Η τιμή αυτή εκφράζει το μικρότερο σωματίδιο που θεωρείται ως στερεό σωματίδιο και αποτελεί το όριο μεταξύ στερεάς και κολλοειδούς καταστάσεως. Οδηγίες για τον καθορισμό των συνθηκών φυγοκέντρωσης δίδονται στο παράρτημα 4.

Εάν με τον υφιστάμενο φυγοκεντρικό εξοπλισμό δεν μπορεί να διασφαλιστεί η απομάκρυνση σωματιδίων μεγαλύτερων από 0.2 μm , μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνδυασμός φυγοκέντρωσης και διήθησης με φίλτρα 0.2 μm . Τα φίλτρα αυτά θα πρέπει να είναι από κατάλληλο αδρανές υλικό για την αποφυγή τυχόν απωλειών της υπό δοκιμή ουσίας σε αυτά. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι δεν υπάρχει περίπτωση απωλειών της υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια της διήθησης.

1.9.2 Μέρος 1- Προκαταρκτική μελέτη

Ο σκοπός της διεξαγωγής προκαταρκτικής μελέτης έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο του πεδίου εφαρμογής. Κατευθύνσεις για τη διεξαγωγή της δοκιμής αυτής δίδονται με το περιγραφόμενο κατωτέρω πείραμα.

1.9.2.1 Επιλογή των άριστων λόγων εδάφους/διάλυμα

Χρησιμοποιούνται δύο τύποι εδαφών και τρεις λόγοι εδάφους/διάλυμα (έξι πειράματα). Ο ένας τύπος εδάφους έχει υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και χαμηλή σε άργιλο ενώ ο άλλος έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και υψηλή σε άργιλο. Προτείνονται οι ακόλουθοι λόγοι:

-50 g εδάφους και 50 cm^3 υδατικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (λόγος 1/1);

-10 g εδάφους και 50 cm^3 υδατικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (λόγος 1/5);

-2 g εδάφους και 50 cm^3 υδατικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (λόγος 1/25).

Η ελάχιστη ποσότητα εδάφους στην οποία μπορεί να εκτελεστεί το πείραμα εξαρτάται από τον εργαστηριακό εξοπλισμό και την απόδοση των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών μεθόδων. Πάντως, συνιστάται να χρησιμοποιείται ποσότητα τουλάχιστον 1 g, και κατά προτίμηση 2 g, για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων από τη δοκιμή.

Σε δείγμα-μάρτυρα που αποτελείται μόνον από την υπό δοκιμή ουσία σε διάλυμα 0.01 M CaCl_2 (χωρίς έδαφος) εφαρμόζονται τα ίδια ακριβώς βήματα όπως και στα υπό δοκιμή συστήματα, για να ελεγχθεί η σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα του CaCl_2 και η πιθανή της προσρόφηση στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων.

Για κάθε τύπο εδάφους διενεργείται τυφλό πείραμα με την ίδια ποσότητα εδάφους και συνολικό όγκο 50 cm^3 διαλύματος 0.01 M CaCl_2 (χωρίς υπό δοκιμή ουσία) ακολουθώντας την ίδια διαδικασία δοκιμής. Το πείραμα αυτό χρησιμεύει ως βασικός μάρτυρας κατά τη διάρκεια της ανάλυσης για την ανίχνευση τυχόν παρεμβαινουσών ουσιών ή μολυσμένων εδαφών.

?Όλα τα πειράματα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων και των τυφλών, θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον εις διπλούν. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη μπορεί να υπολογιστεί με βάση τη μεθοδολογία που θα ακολουθηθεί.

Οι μέθοδοι για την προκαταρκτική μελέτη και την κύρια μελέτη είναι γενικά οι ίδιες, τυχόν δε εξαιρέσεις πρέπει να αναφέρονται.

Τα ξηραμένα στον αέρα δείγματα φέρονται σε κατάσταση ισορροπίας αναδεύοντάς τα με 45 cm^3 0.01 M CaCl_2 όλη τη νύκτα (12 h) πριν από την ημέρα του πειράματος. Στη συνέχεια, προστίθεται ορισμένος όγκος αρχικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας μέχρι τελικού όγκου 50 cm^3 . Ο προστιθέμενος αυτός όγκος αρχικού διαλύματος: (α) δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10% του τελικού όγκου των 50 cm^3 της υδατικής φάσης ώστε η μεταβολή στη φύση του προ της ισορροπίας διαλύματος να είναι όσο το δυνατό μικρότερη και (β) θα πρέπει κατά προτίμηση να οδηγεί σε μία αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας που έρχεται σε επαφή με το έδαφος (C_0) δύο τάξεις μεγέθους τουλάχιστον υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου. Το ελάχιστο αυτό όριο εξασφαλίζει την πραγματοποίηση ορθών μετρήσεων ακόμη κι όταν υπάρχει υψηλή προσρόφηση (> 90%) και τον προσδιορισμό αργότερα των ισοθέμων προσρόφησης. Συνιστάται επίσης, εφόσον είναι δυνατό, η αρχική συγκέντρωση της ουσίας (C_0) να μην υπερβαίνει το ήμισυ του ορίου διαλυτότητάς της.

?Ένα παράδειγμα του τρόπου υπολογισμού της συγκέντρωσης του αρχικού διαλύματος (C_a) δίδεται παρακάτω. Υποτίθεται ότι το όριο ανίχνευσης είναι 0.01 mg cm^{-3} και η προσρόφηση 90%. ?Έτσι, η αρχική συγκέντρωση της σε επαφή με το έδαφος υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει κατά προτίμηση να είναι 1 mg cm^{-3} (δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης). Υποθέτοντας ότι προστίθεται ο μέγιστος συνιστώμενος όγκος του αρχικού διαλύματος δηλ. 5 έως 45 cm^3 διαλύματος εξισορρόπησης 0.01 M CaCl_2 (= 10% του αρχικού διαλύματος έως τα 50 cm^3 συνολικού όγκου της υδατικής φάσης), η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος θα πρέπει να είναι 10 mg cm^{-3} . Η τιμή αυτή είναι τρεις τάξεις μεγέθους υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου.

Πριν και μετά την επαφή με το έδαφος θα πρέπει να μετρείται το pH της υδατικής φάσης επειδή παίζει σπουδαίο ρόλο στην όλη διεργασία προσρόφησης, ειδικά στην περίπτωση ιονίσμων ουσιών.

Το μίγμα ανακινείται μέχρις ότου επιτευχθεί ισορροπία προσρόφησης. Ο χρόνος ισορροπίας στα διάφορα εδάφη παρουσιάζει υψηλή διαφοροποίηση, ανάλογα με την ουσία και το έδαφος. Γενικά, 24 h είναι αρκετές (77). Στην προκαταρκτική μελέτη, τα δείγματα μπορούν να συλλέγονται αλληλοδιαδόχως μέσα σε 48ωρο διάστημα ανάμειξης (π.χ. 4, 8, 24, 48 h). Εντούτοις, οι χρόνοι αναλύσεως θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με ελαστικότητα σε σχέση με το χρονοδιάγραμμα στο εργαστήριο.

Υπάρχουν δύο επιλογές για την ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας στο υδατικό διάλυμα: (α) η παράλληλη μέθοδος και (β) η εν σειρά μέθοδος. Θα πρέπει να τονιστεί ότι, αν και η παράλληλη μέθοδος είναι πειραματικά πιο κουραστική, η μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι απλούστερη (παράρτημα 5). Πάντως, η επιλογή της μεθοδολογίας που πρέπει να ακολουθηθεί, επαφίεται στον πειραματιζόμενο ο οποίος θα πρέπει να εξετάζει τις διαθέσιμες εργαστηριακές διευκολύνσεις και πόρους.

(α) παράλληλη μέθοδος: παρασκευάζονται δείγματα με τον ίδιο λόγο εδάφους/διάλυμα, τόσα όσα και τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα στα οποία επιθυμείται να μελετηθεί η κινητική προσρόφησης. Μετά τη φυγοκέντρωση και, εφόσον επιθυμείται, τη διήθηση, η υδατική φάση του πρώτου σωλήνα ανακτάται όσο το δυνατό πληρέστερα και μετρείται μετά π.χ. 4 h, εκείνη του δεύτερου σωλήνα μετά 8 h, εκείνη του τρίτου σωλήνα μετά 24, κλπ.

(β) εν σειρά μέθοδος: για κάθε λόγο εδάφους/διάλυμα παρασκευάζεται μόνον ένα διπλό δείγμα. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα το μίγμα φυγοκεντρείται για να διαχωριστούν οι φάσεις. Μικρή ποσότητα της υδατικής φάσης υποβάλλεται αμέσως σε ανάλυση για την υπό δοκιμή ουσία, κατόπιν δε το πείραμα συνεχίζεται με το αρχικό μίγμα. Εφόσον μετά τη φυγοκέντρωση ακολουθεί διήθηση, το εργαστήριο θα πρέπει να διαθέτει το σχετικό εξοπλισμό για το χειρισμό της διήθησης μικρών υδατικών ποσοτήτων. Συνιστάται ο συνολικός όγκος των λαμβανομένων ποσοτήτων να μην υπερβαίνει το 1% του συνολικού όγκου του διαλύματος, για να μην αλλάζει σημαντικά ο λόγος εδάφους/διάλυμα και μειώνεται η μάζα της διαθέσιμης για προσρόφηση κατά τη διάρκεια της δοκιμής διαλελυμένης ουσίας.

Η ποσοστιαία προσρόφηση A_{t_1} υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή (t_1) με βάση την ονομαστική αρχική συγκέντρωση και τη μετρούμενη συγκέντρωση κατά το χρόνο δειγματοληψίας (t_1), διορθωμένη ως προς την τιμή του τυφλού. Για την εκτίμηση της επίτευξης κατάστασης² ισορροπίας χαράσσονται καμπύλες της A_{t_1} συναρτήσει του χρόνου (Εικ. 1 παράρτημα 5) ενώ υπολογίζεται επίσης και η τιμή K_d στην ισορροπία. Με βάση την τιμή αυτή K_d , επιλέγονται από την εικ. 1 κατάλληλοι λόγοι εδάφους/διάλυμα, έτσι ώστε η εκατοστιαία προσρόφηση να φθάνει πάνω από το 20% και κατά προτίμηση >50% (61). 'Όλες οι εφαρμοζόμενες εξισώσεις και αρχές σχεδιασμού της γραφικής παράστασης δίδονται στο τμήμα "Δεδομένα και έκθεση αναφοράς" και στο παράρτημα 5.

1.9.2.2 Προσδιορισμός του χρόνου αποκατάστασης ισορροπίας προσρόφησης και της ποσότητας της προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας κατά την ισορροπία.

Όπως αναφέρθηκε ήδη, με τις γραφικές παραστάσεις των A_{t_1} ή C_{aq}^{ads} συναρτήσει του χρόνου επιτυγχάνεται η εκτίμηση της επίτευξης ισορροπίας προσρόφησης και της ποσότητας της προσροφημένης στην ισορροπία υπό δοκιμή ουσίας. Στις εικ. 1 και 2 του παραρτήματος 5 εμφανίζονται παραδείγματα τέτοιων γραφικών παραστάσεων. Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας είναι ο χρόνος που χρειάζεται το σύστημα για να φθάσει σε οριζόντιωση της καμπύλης.

Εάν, σε ένα συγκεκριμένο έδαφος, δεν εμφανίζεται οριζόντιωση αλλά μόνο σταθερή αύξηση, αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους πολύπλοκους παράγοντες όπως βιοαποικοδόμηση ή βραδεία διάχυση. Το φαινόμενο της βιοαποικοδόμησης μπορεί να καταδειχθεί επαναλαμβάνοντας το πείραμα με ένα στείρο δείγμα εδάφους. Εάν, ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, δεν εμφανιστεί οριζόντιωση, ο πειραματιζόμενος θα πρέπει να ερευνήσει και για άλλα φαινόμενα που μπορεί να εμπλέκονται στις συγκεκριμένες μελέτες του. Αυτό μπορεί να γίνει με κατάλληλες τροποποιήσεις των συνθηκών πειραματισμού (θερμοκρασία, χρόνοι ανάδευσης, λόγοι εδάφους/διάλυμα). Εναπόκειται στον πειραματιζόμενο να αποφασίσει αν θα συνεχίσει τη διαδικασία δοκιμής παρά το ενδεχόμενο αποτυχίας στην αποκατάσταση ισορροπίας.

1.9.2.3 Προσρόφηση στην επιφάνεια του δοκιμαστικού δοχείου και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας

Από την ανάλυση των δειγμάτων-μαρτύρων μπορεί να ληφθούν ορισμένες πληροφορίες για την προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων. Εάν παρατηρηθεί έλλειμμα μεγαλύτερο από το τυποποιημένο σφάλμα της αναλυτικής μεθόδου, αυτό μπορεί να σημαίνει την ύπαρξη αβιοτικής αποικοδόμησης και/ή προσρόφησης στην επιφάνεια του δοκιμαστικού δοχείου. Διάκριση μεταξύ των δύο αυτών φαινομένων μπορεί να γίνει πλέοντας προσεκτικά τα τοιχώματα του δοχείου με γνωστό όγκο κατάλληλου διαλύτη και υποβάλλοντας το διάλυμα πλύσεως σε ανάλυση για την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων δεν παρατηρηθεί προσρόφηση, το έλλειμμα αποδεικνύει αβιοτική αστάθεια της υπό δοκιμή ουσίας. Εφόσον διαπιστωθεί προσρόφηση, είναι αναγκαία η αλλαγή του υλικού των δοκιμαστικών δοχείων. Πάντως, τα δεδομένα για την προσρόφηση στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων που λαμβάνονται από αυτό το πείραμα δεν μπορούν να παρεκταθούν άμεσα στο πείραμα εδάφους/διάλυμα. Η παρουσία του εδάφους επηρεάζει την προσρόφηση αυτή.

Πρόσθετες πληροφορίες για τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας μπορούν να αντληθούν προσδιορίζοντας το υπόλοιπο της αρχικής μάζας κατά τη διάρκεια του χρόνου. Αυτό σημαίνει ότι πραγματοποιείται ανάλυση για την υπό δοκιμή ουσία στην υδατική φάση, στα εδαφικά εκχυλίσματα και τα τοιχώματα του δοκιμαστικού δοχείου. Η διαφορά μεταξύ της μάζας της προστιθέμενης υπό δοκιμή ουσίας και του αθροίσματος των μαζών της χημικής ουσίας στην υδατική φάση, τα εδαφικά εκχυλίσματα και τα τοιχώματα του δοκιμαστικού δοχείου, είναι ίση με την αποικοδομημένη μάζα και/ή απωλεσθείσα λόγω πτητικότητας και/ή μη εκχυλισθείσα. Για τον προσδιορισμό του υπολοίπου, θα πρέπει να έχει αποκατασταθεί ισορροπία προσρόφησης μέσα στο χρονικό διάστημα του πειράματος.

² Οι γραφικές παραστάσεις συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση (C_{aq}^{ads}) συναρτήσει του χρόνου θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της επίτευξης κατάστασης ισορροπίας (Εικ. 2 παράρτημα 5).

Η ανάλυση για το υπόλοιπο μάζας εκτελείται σε εδάφη και για ένα λόγο εδάφους/διάλυμα ανά έδαφος που εμφανίζει έλλειμμα πάνω από 20% και κατά προτίμηση >50% στην κατάσταση ισορροπίας. Όταν το πείραμα ανεύρεσης του λόγου ολοκληρωθεί με την ανάλυση του τελευταίου δείγματος της υδατικής φάσης μετά 48 h, οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση και, εφόσον επιθυμείται, διήθηση. Η υδατική φάση ανακτάται όσο το δυνατό πληρέστερα και στο έδαφος προστίθεται κατάλληλος διαλύτης εκχυλίσεως (συντελεστής εκχυλίσεως τουλάχιστον 95%) για την εκχύλιση της υπό δοκιμή ουσίας. Συνιστάται η πραγματοποίηση δύο τουλάχιστον διαδοχικών εκχυλίσεων. Προσδιορίζεται η ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος και τα εκχυλίσματα του δοκιμαστικού δοχείου και υπολογίζεται το υπόλοιπο μάζας (εξίσωση 10, Δεδομένα και έκθεση αναφοράς). Εάν είναι λιγότερο από 90%, η υπό δοκιμή ουσία θεωρείται ως ασταθής στη χρονοκλίμακα της δοκιμής. Πάντως, οι μελέτες μπορούν ακόμη να συνεχιστούν, λαμβάνοντας υπόψη την αστάθεια της υπό δοκιμή ουσίας. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται να υποβάλλονται σε ανάλυση και οι δύο φάσεις στην κύρια μελέτη.

1.9.2.4 Μέρος 2 - Κινητική προσρόφησης σε μία συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας

Χρησιμοποιούνται πέντε εδάφη που επιλέγονται από τον πίνακα 1. Το να συμπεριληφθούν μεταξύ των πέντε αυτών εδαφών ορισμένα ή και όλα τα εδάφη που χρησιμοποιούνται στην προκαταρκτική μελέτη, αποτελεί πλεονέκτημα. Στην περίπτωση αυτή, το μέρος 2 δεν χρειάζεται να επαναληφθεί για τα εδάφη που χρησιμοποιούνται στην προκαταρκτική μελέτη.

Ο χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας, ο λόγος εδάφους/διάλυμα, το βάρος του εδαφικού δείγματος, ο όγκος της υδατικής φάσης που είναι σε επαφή με το έδαφος και η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα επιλέγονται με βάση τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής μελέτης. Η ανάλυση θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση περίπου μετά 2, 4, 6, 8 (ενδεχομένως και 10) και 24 h επαφής. Ο χρόνος ανάδευσης μπορεί να φθάσει το πολύ τις 48 h στην περίπτωση που μια χημική ουσία απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο αποκατάστασης ισορροπίας σε σχέση με τα αποτελέσματα εύρεσης του λόγου. Πάντως, οι χρόνοι ανάλυσης μπορούν να αντιμετωπίζονται με ελαστικότητα.

Κάθε πείραμα (ένα έδαφος και ένα διάλυμα) γίνεται τουλάχιστον εις διπλούν για να μπορέσει να γίνει εκτίμηση της διακύμανσης των αποτελεσμάτων. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται και ένα τυφλό. Αποτελείται από το έδαφος και διάλυμα 0.01 M CaCl₂, χωρίς υπό δοκιμή ουσία, ενώ το βάρος και ο όγκος, αντίστοιχα, είναι ίδιος με εκείνους του πειράματος. Δείγμα-μάρτυρας που περιέχει μόνο την υπό δοκιμή ουσία σε διάλυμα 0.01 M CaCl₂ (χωρίς έδαφος) υποβάλλεται την ίδια διαδικασία δοκιμής, ενέργεια που αποβλέπει στη διασφάλιση του πειράματος από τυχόν απρόσμενα.

Η ποσοστιαία προσρόφηση υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή A_{t_i} και/ή χρονικό διάστημα Δt_i (ανάλογα με τις ανάγκες) και παρίσταται ως γραφική συνάρτηση του χρόνου. Υπολογίζονται επίσης ο συντελεστής κατανομής K_d στην ισορροπία καθώς επίσης και ο τυποποιημένος συντελεστής κατανομής οργανικού άνθρακα K_{oc} (για μη πολικές οργανικές χημικές ουσίες).

Αποτελέσματα της δοκιμής κινητικής προσροφήσεως

Η γραμμική K_d τιμή περιγράφει γενικά με ορθότητα τη ροφητική συμπεριφορά στο έδαφος (35)(78) και αποτελεί έκφραση της εγγενούς κινητικότητας των χημικών στο έδαφος. Σε γενικές γραμμές, π.χ., ουσίες με $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ θεωρούνται ως ποιοτικώς κινητικές. Ομοίως, από τους MacCall *et al.* (16), έχει αναπτυχθεί ένα σχήμα ταξινόμησης κινητικότητας με βάση τις τιμές K_{oc} . Επιπλέον, υπάρχουν σχήματα ταξινόμησης αποπλύσεων που βασίζονται σε μία σχέση μεταξύ K_{oc} και $DT-50^3$ (32)(79).

Επίσης, σύμφωνα με μελέτες ανάλυσης σφαλμάτων (61), τιμές K_d κάτω των $0.3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ δεν μπορούν να εκτιμηθούν ορθά από τη μείωση της συγκέντρωσής τους στην υδατική φάση, ακόμη κι όταν εφαρμόζεται η ευνοϊκότερη (από πλευράς ορθότητας) σχέση εδάφους/διάλυμα, δηλ. 1:1. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται να γίνεται ανάλυση και των δύο φάσεων, εδάφους και διαλύματος.

³ DT-50: χρόνος αποικοδόμησης για το 50% της υπό δοκιμή ουσίας.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, συνιστάται η μελέτη της προσροφητικής συμπεριφοράς μιας ουσίας στο έδαφος και της εν δυνάμει κινητικότητάς της να συνεχίζεται προσδιορίζοντας τις ισοθέριμους προσροφήσεις Freundlich για τα συστήματα αυτά, για τα οποία είναι δυνατός ο ορθός προσδιορισμός της K_d με το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθείται στη μέθοδο αυτή δοκιμής. Ο ορθός προσδιορισμός είναι δυνατός εάν η τιμή η οποία προκύπτει πολλαπλασιάζοντας την K_d με το λόγο εδάφους/διάλυμα είναι > 0.3 , όταν οι μετρήσεις βασίζονται στη μείωση της συγκέντρωσης στην υδατική φάση (έμμεση μέθοδος), ή > 0.1 , όταν αναλύονται και οι δύο φάσεις (άμεση μέθοδος) (61).

1.9.2.5 Μέρος 3 - Ισόθερμοι προσρόφησης και κινητική εκρόφησης/ισόθερμοι εκρόφησης

1.9.2.5.1 Ισόθερμοι προσρόφησης

Χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις υπό δοκιμή ουσίας, που καλύπτουν κατά προτίμηση δύο τάξεις μεγέθους. Για την επιλογή αυτών των συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η υδατοδιαλυτότητα και οι προκύπτουσες συγκεντρώσεις υδατικής ισορροπίας. Καθ' όλη τη μελέτη, θα πρέπει να τηρείται ο ίδιος λόγος εδάφους/διάλυμα κατά έδαφος. Η δοκιμή προσρόφησης εκτελείται όπως περιγράφεται ανωτέρω, με μόνη τη διαφορά ότι η υδατική φάση αναλύεται μόνο μία φορά κατά το χρόνο που απαιτείται για την επίτευξη ισορροπίας όπως προσδιορίστηκε προηγουμένως στο Μέρος 2. Οι συγκεντρώσεις ισορροπίας στο διάλυμα προσδιορίζονται και η προσροφημένη ποσότητα υπολογίζεται από τη μείωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα ή με την άμεση μέθοδο. Η προσροφημένη μάζα ανά μονάδα μάζας εδάφους παρίσταται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης ισορροπίας της υπό δοκιμή ουσίας (βλ. Δεδομένα και έκθεση αναφοράς).

Αποτελέσματα από το πείραμα ισοθέριμων προσρόφησης

Μεταξύ των μέχρι τούδε προταθέντων μαθηματικών μοντέλων προσρόφησης, η ισόθερμος Freundlich είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη για την περιγραφή διεργασιών προσρόφησης. Λεπτομερέστερες πληροφορίες για την ερμηνεία και σπουδαιότητα των μοντέλων προσρόφησης παρέχονται στις παραπομπές (41)(45)(80)(81)(82).

Σημείωση: Θα πρέπει να αναφερθεί ότι σύγκριση τιμών K_F (συντελεστής προσρόφησης Freundlich) για διάφορες ουσίες είναι δυνατή μόνον εφόσον αυτές οι τιμές K_F εκφράζονται στις ίδιες μονάδες (83).

1.9.2.5.2 Κινητική εκρόφησης

Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να διερευνηθεί αν μια χημική ουσία προσροφάται σε ένα έδαφος με τρόπο αναστρέψιμο ή μη. Οι πληροφορίες αυτές είναι σημαντικές, γιατί η διεργασία εκρόφησης παίζει και αυτή σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά μιας χημικής ουσίας σε ένα εδαφικό πεδίο. Περαιτέρω, τα δεδομένα εκρόφησης αποτελούν χρήσιμα προς εισαγωγή στοιχεία στη μέσω υπολογιστών σχεδίαση μοντέλων απόπλυσης και προσομοίωση απορροής διαλυμένων ουσιών. Εφόσον επιθυμείται η διενέργεια μελέτης εκρόφησης, συνιστάται η μελέτη που περιγράφεται κατωτέρω να πραγματοποιείται σε κάθε σύστημα για το οποίο κατέστη δυνατός ο επακριβής προσδιορισμός του K_d στο προηγούμενο πείραμα κινητικής προσρόφησης.

?Όπως και στη μελέτη της κινητικής προσρόφησης, υπάρχουν δύο επιλογές για την πραγματοποίηση του πειράματος της κινητικής εκρόφησης: (α) η παράλληλη μέθοδος και (β) η εν σειρά μέθοδος. Η επιλογή της προς εφαρμογή μεθοδολογίας εναπόκειται στον ερευνητή ο οποίος πρέπει να λαμβάνει υπόψη του τις διαθέσιμες εργαστηριακές εγκαταστάσεις και πόρους.

(α) παράλληλη μέθοδος: για κάθε έδαφος που επιλέγεται να υποβληθεί σε μελέτη εκρόφησης, παρασκευάζονται δείγματα με τον ίδιο λόγο εδάφους/διάλυμα, όσα είναι και τα χρονικά διαστήματα στα οποία επιθυμείται να μελετηθεί η κινητική εκρόφησης. Κατά προτίμηση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα ίδια χρονικά διαστήματα με εκείνα του πειράματος της κινητικής προσρόφησης. Εντούτοις, ο συνολικός χρόνος μπορεί να παραταθεί όσο χρειάζεται ώστε το σύστημα να φθάσει σε ισορροπία εκρόφησης. Σε κάθε πείραμα (ένα έδαφος, ένα διάλυμα) αντιστοιχεί και ένα τυφλό. Το τυφλό συνίσταται από το έδαφος και διάλυμα 0,01 M CaCl₂, χωρίς υπό δοκιμή ουσία, αλλά με το ίδιο βάρος και όγκο, αντίστοιχα, με εκείνα του πειράματος. Στην ίδια διαδικασία δοκιμής υποβάλλεται ως δείγμα-μάρτυρας η υπό δοκιμή ουσία σε διάλυμα 0.01 M CaCl₂ (χωρίς έδαφος). Όλα τα μίγματα του εδάφους με το διάλυμα αναδεύονται μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία προσρόφησης (όπως καθορίστηκε προηγουμένως στο τμήμα 2). Κατόπιν, οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση και οι υδατικές φάσεις απομακρύνονται όσο το δυνατό πληρέστερα. Ο όγκος του απομακρυνόμενου διαλύματος αντικαθίσταται από ίσο όγκο διαλύματος 0.01 M CaCl₂ χωρίς υπό δοκιμή ουσία και τα νέα μίγματα αναδεύονται ξανά. Η υδατική φάση του πρώτου σωλήνα ανακτάται όσο το δυνατό πληρέστερα και μετρείται έπειτα από, π.χ., 2 ώρες, εκείνη του δεύτερου σωλήνα έπειτα από 4 ώρες, εκείνη του τρίτου έπειτα από 6 ώρες, μέχρις ότου να επιτευχθεί ισορροπία εκρόφησης.

(β) εν σειρά μέθοδος: μετά το πείραμα της κινητικής προσρόφησης, το μίγμα φυγοκεντρείται και η υδατική φάση απομακρύνεται κατά το δυνατό πληρέστερα. Ο όγκος του απομακρυνόμενου διαλύματος αντικαθίσταται από ίσο όγκο 0.01 M CaCl₂ χωρίς υπό δοκιμή ουσία. Το νέο μίγμα αναδεύεται μέχρις ότου επιτευχθεί ισορροπία εκρόφησης. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, το μίγμα φυγοκεντρείται προς διαχωρισμό των φάσεων. Μικρή ποσότητα της υδατικής φάσης υποβάλλεται αμέσως σε ανάλυση. Κατόπιν, το πείραμα συνεχίζεται με το αρχικό μίγμα. Ο όγκος κάθε επιμέρους ποσότητας θα πρέπει να είναι λιγότερο του 1% του συνολικού όγκου. Η ίδια ποσότητα πρόσφατου διαλύματος 0.01 M CaCl₂ προστίθεται στο μίγμα προς διατήρηση του λόγου εδάφους προς διάλυμα και η ανάδευση συνεχίζεται μέχρι το επόμενο χρονικό διάστημα.

Η ποσοστιαία εκρόφηση υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή (D_{t_1}) και/ή χρονικό διάστημα ($D_{\Delta t_1}$) (ανάλογα με τις ανάγκες της μελέτης) και παρίσταται γραφικώς συναρτήσεως του χρόνου. Υπολογίζεται επίσης ο συντελεστής εκρόφησης K_{des} στην κατάσταση ισορροπίας. Όλες οι εξισώσεις που εφαρμόζονται δίδονται στο τμήμα "Δεδομένα και έκθεση αναφοράς" και στο Παράρτημα 5.

Αποτελέσματα από το πείραμα κινητικής εκρόφησης

Με κοινές γραφικές παραστάσεις της ποσοστιαίας εκρόφησης D_{t_1} και προσρόφησης A_{t_1} συναρτήσεως του χρόνου είναι δυνατή η εκτίμηση της αναστρεψιμότητας της διεργασίας προσρόφησης. Εάν η ισορροπία εκρόφησης επιτευχθεί έστω και στο διπλάσιο του χρόνου της ισορροπίας προσρόφησης, και η συνολική εκρόφηση είναι πάνω από το 75% της προσροφηθείσας ποσότητας, η προσρόφηση θεωρείται ότι είναι αναστρέψιμη.

1.9.2.5.3 Ισόθερμοι εκρόφησης

Οι ισόθερμοι εκρόφησης Freundlich προσδιορίζονται στα εδάφη που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα των ισόθερων προσρόφησης. Η δοκιμή εκρόφησης εκτελείται όπως περιγράφεται στην ενότητα "Κινητική εκρόφησης", με μόνη τη διαφορά ότι η υδατική φάση υποβάλλεται μόνο μια φορά σε ανάλυση, στην κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης. Υπολογίζεται η ποσότητα της εκροφηθείσας υπό δοκιμή ουσίας. Η ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης παρίσταται γραφικώς ως συνάρτηση της συγκέντρωσης ισορροπίας της εν διαλύματι υπό δοκιμή ουσίας (βλ. Δεδομένα και έκθεση αναφοράς και παράρτημα 5).

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Τα αναλυτικά στοιχεία παρουσιάζονται με τη μορφή πίνακα (βλ. παράρτημα 6). Δίδονται οι επιμέρους μετρήσεις και οι υπολογισθέντες μέσοι όροι. Παρέχονται γραφικές παραστάσεις των ισόθερων προσρόφησης. Οι υπολογισμοί πραγματοποιούνται όπως περιγράφεται κατωτέρω.

Για τους σκοπούς της δοκιμής, θεωρείται ότι το βάρος 1 cm³ υδατικού διαλύματος είναι 1g. Ο λόγος εδάφους/διάλυμα μπορεί να εκφραστεί σε μονάδες w/w ή w/vol με τον ίδιο αριθμό.

Ως προσρόφηση (A_{t_i}) ορίζεται η % ποσότητα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας σε σχέση με την ποσότητα που υπήρχε στην αρχή της δοκιμής, υπό τις συνθήκες δοκιμής. Εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι σταθερή και δεν προσροφάται σημαντικά στα τοιχώματα του δοχείου, η A_{t_i} υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή t_i , σύμφωνα με την εξίσωση:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (3)$$

όπου:

A_{t_i} = ποσοστιαία προσρόφηση τη χρονική στιγμή t_i , (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας τη στιγμή t_i , (μg);

m_0 = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοκιμαστικό σωλήνα στην αρχή της δοκιμής (μg).

Λεπτομερείς πληροφορίες για τον τρόπο υπολογισμού του ποσοστού προσρόφησης A_{t_i} με την παράλληλη και εν σειρά μέθοδο δίδονται στο παράρτημα 5.

Συντελεστής κατανομής K_d είναι ο λόγος μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας στην εδαφική φάση και της κ.ο. συγκέντρωσης της ουσίας στο υδατικό διάλυμα, υπό τις συνθήκες δοκιμής, όταν επιτευχθεί ισορροπία προσρόφησης.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

όπου:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = συγκέντρωση της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας σε ισορροπία προσρόφησης ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = κ.ο. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε ισορροπία προσρόφησης ($\mu\text{g cm}^{-3}$). Η συγκέντρωση αυτή προσδιορίζεται αναλυτικώς λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές που λαμβάνονται από τα τυφλά

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας σε ισορροπία προσρόφησης (μg)

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = μάζα της ουσίας στο διάλυμα σε ισορροπία προσρόφησης (μg)

m_{soil} = ποσότητα της εδαφικής φάσης, εκφρασμένη σε ξηρή μάζα εδάφους (g)

V_0 = αρχικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος (cm^3).

Η σχέση μεταξύ A_{eq} και K_d δίδεται από τον τύπο:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

όπου:

A_{eq} = ποσοστιαία προσρόφηση στην κατάσταση ισορροπίας, %.

Ο τυποποιημένος συντελεστής προσρόφησης οργανικού άνθρακα K_{oc} παρέχει τη σχέση του συντελεστή κατανομής K_d με την περιεκτικότητα του εδαφικού δείγματος σε οργανικό άνθρακα:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

όπου:

$\%oc$ = ποσοστό οργανικού άνθρακα στο εδαφικό δείγμα (g g^{-1}).

Ο συντελεστής K_{oc} αντιπροσωπεύει μία μοναδική τιμή που χαρακτηρίζει την κατανομή κυρίως μη πολικών οργανικών χημικών ουσιών μεταξύ οργανικού άνθρακα στο έδαφος ή ίζημα και νερό. Η προσρόφηση των χημικών αυτών ουσιών σχετίζεται με το οργανικό περιεχόμενο του ροφούντος στερεού (7). Έτσι, οι τιμές K_{oc} εξαρτώνται από τα ειδικά χαρακτηριστικά του χουμικών κλασμάτων που διαφέρουν σημαντικά στη ροφητική ικανότητα, λόγω διαφορών στην προέλευση, τη γένεση, κλπ.

2.1.1 Ισόθερμοι προσροφήσεως

Η εξίσωση των ισοθέρων προσροφήσεως Freundlich σχετίζει την ποσότητα της προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα κατά την ισορροπία (εξίσωση 8).

Η επεξεργασία των στοιχείων γίνεται όπως και στην ενότητα "Προσρόφηση" και, για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, υπολογίζεται η συγκέντρωση της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας μετά τη δοκιμή προσρόφησης ($C_s^{ads}(eq)$, αλλαγού δηλούμενη ως x/m). Υποτίθεται ότι έχει επιτευχθεί ισορροπία και ότι το $C_s^{ads}(eq)$ αντιπροσωπεύει την τιμή ισορροπίας:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

Η εξίσωση προσρόφησης Freundlich αντιπροσωπεύεται από τον τύπο (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

ή με τη γραμμική μορφή:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

όπου:

K_F^{ads} = συντελεστής προσρόφησης Freundlich. Οι διαστάσεις του είναι $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ μόνον εφόσον $1/n = 1$. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, στις διαστάσεις του K_F^{ads} εισέρχεται και το $1/n$ ($\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$);

n = σταθερά αναγωγής. Το $1/n$ κυμαίνεται εν γένει μεταξύ 0.7 - 1.0, δείχνοντας ότι τα δεδομένα ροφήσεως είναι συχνά ελαφρώς μη γραμμικά.

Οι εξισώσεις (8) and (9) παρίστανται γραφικώς και οι τιμές των K_F^{ads} και $1/n$ υπολογίζονται με ανάλυση αναγωγής χρησιμοποιώντας την εξίσωση 9. Υπολογίζεται επίσης ο συντελεστής συσχέτισης r^2 της λογαριθμικής εξισώσεως. Παράδειγμα τέτοιων καμπυλών δίδεται στην εικ. 2.

Εικ. 2. Καμπύλη προσρόφησης Freundlich, κανονική και γραμμική

2.1.2 Υπόλοιπο μάζας

Ως υπόλοιπο μάζας (MB) ορίζεται το εκατοστιαίο ποσοστό της ουσίας που μπορεί να ανακτηθεί με αναλυτικά μέσα έπειτα από δοκιμή προσρόφησης συναρτήσει της ονομαστικής ποσότητας της ουσίας στην αρχή της δοκιμής.

Η επεξεργασία των στοιχείων διαφέρει εάν ο διαλύτης είναι πλήρως αναμειζιμος με νερό. Στην περίπτωση υδατοαναμειζιμου διαλύτη, για τον προσδιορισμό της ποσότητας της ουσίας που ανακτάται με εκχύλιση με διαλύτη, μπορεί να εφαρμοστεί η επεξεργασία των στοιχείων που περιγράφεται στο κεφάλαιο “Εκρόφηση”. Εάν ο διαλύτης είναι λιγότερο αναμειζιμος με νερό, πρέπει να γίνεται προσδιορισμός της ποσότητας.

Το υπόλοιπο μάζας MB για την προσρόφηση υπολογίζεται ως εξής: υποτίθεται ότι ο όρος (m_E) αντιστοιχεί στο άθροισμα των χημικών μαζών που εκχυλίζονται από το έδαφος και την επιφάνεια του δοκιμαστικού δοχείου με οργανικό διαλύτη:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

όπου:

MB = υπόλοιπο μάζας (%);

m_E = ολική μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που εκχυλίζεται από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοκιμαστικού δοχείου σε δύο στάδια (μg);

C_0 = αρχική κ. ο. συγκέντρωση του υπό δοκιμή διαλύματος σε επαφή με το έδαφος ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

V_{rec} = όγκος του υπερκειμένου που ανακτάται μετά την ισορροπία προσρόφησης (cm^{-3}).

Ως **εκρόφηση** (D) ορίζεται το ποσοστό της υπό δοκιμή ουσίας που εκροφάται σε σχέση με την προηγουμένως προσροφηθείσα ποσότητα ουσίας, υπό τις συνθήκες δοκιμής:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

όπου:

D_{t_i} = ποσοστό εκρόφησης τη χρονική στιγμή t_i , (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = μάζα της εκροφημένης από το έδαφος υπό δοκιμή ουσίας τη χρονική στιγμή t_i , (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας κατά την ισορροπία προσρόφησης (μg).

Λεπτομερείς πληροφορίες για τον τρόπο υπολογισμού του ποσοστού εκρόφησης D_{t_i} στην παράλληλη και εν σειρά μέθοδο δίδονται στο παράρτημα 5.

Φαινόμενος συντελεστής εκρόφησης (K_{des}), υπό τις συνθήκες δοκιμής, είναι η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας που παραμένει στην εδαφική φάση και της κ.ο. συγκέντρωσης της εκροφημένης ουσίας στο υδατικό διάλυμα, όταν επιτευχθεί ισορροπία εκρόφησης:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \cdot \frac{V_T}{m_{soil}} \quad (cm^3 \cdot g^{-1}) \quad (12)$$

όπου:

K_{des} = συντελεστής εκρόφησης ($cm^3 \cdot g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = συνολική μάζα της εκροφημένης από το έδαφος ουσίας στην ισορροπία εκρόφησης, (μg);

V_T = συνολικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος κατά τη διάρκεια της δοκιμής κινητικής εκρόφησης (cm^3).

Οδηγίες για τον υπολογισμό της $m_{aq}^{des}(eq)$ δίδονται στο παράρτημα 5 υπό τον τίτλο “Εκρόφηση”.

Παρατήρηση

Εάν η προηγηθείσα δοκιμή προσρόφησης εκτελέστηκε με την παράλληλη μέθοδο, ο όγκος V_T στην εξίσωση (12) θεωρείται ότι είναι ίσος με V_0 .

2.2.1

Ισόθερμοι εκρόφησης

Η εξίσωση των **ισοθέρων εκρόφησης Freundlich** δίνει την υπάρχουσα σχέση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης (εξίσωση 16).

Για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, η συγκέντρωση της ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης υπολογίζεται ως εξής:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \quad (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ ορίζεται ως :

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_F^F} - m_{aq}^A \quad (\mu g) \quad (14)$$

όπου:

$C_s^{des}(eq)$ = συγκέντρωση της υπό δοκιμής ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης ($\mu g g^{-1}$)

$m_m^{des}(eq)$ = μάζα ουσίας που προσδιορίζεται αναλυτικώς στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης (μg)

m_{aq}^A = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που περισσεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = μάζα της ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_F^F = όγκος του διαλύματος που παραλαμβάνεται από το σωλήνα για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης, (cm^3)

V_R = όγκος του υπερκείμενου υγρού που απομακρύνεται από το σωλήνα μετά την επίτευξη ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται από το ίδιο όγκο διαλύματος 0.01 M $CaCl_2$, (cm^3);

Η εξίσωση εκρόφησης Freundlich δίνεται από τον τύπο (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \quad (\mu g g^{-1}) \quad (16)$$

ή με γραμμική μορφή:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

όπου:

K_F^{des} = συντελεστής εκρόφησης Freundlich,

n = σταθερά αναγωγής,

$C_{aq}^{des}(eq)$ = κ.ο. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης ($\mu g cm^{-3}$).

Οι εξισώσεις (16) and (17) μπορούν να παρασταθούν γραφικώς και οι τιμές των K_F^{des} και $1/n$ υπολογίζονται με ανάλυση αναγωγής χρησιμοποιώντας την εξίσωση 17.

Παρατήρηση:

Εάν ο εκθέτης προσρόφησης ή εκρόφησης Freundlich $1/n$ είναι ίσος με 1, οι σταθερές συνδέσεως προσρόφησης ή εκρόφησης Freundlich (K_F^{ads} και K_F^{des}) θα είναι ίσες με τις σταθερές ισορροπίας προσρόφησης ή εκρόφησης (K_d και K_{des}) αντιστοίχως, και οι καμπύλες των C_s vs C_{aq} θα είναι γραμμικές. Εάν οι εκθέτες δεν είναι ίσοι με 1, οι καμπύλες των C_s vs C_{aq} δεν θα είναι γραμμικές και οι σταθερές προσρόφησης και εκρόφησης θα διαφέρουν κατά μήκος των ισοθέρμων.

2.2.2

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

- Η πλήρης ταυτότητα των χρησιμοποιηθέντων εδαφικών δειγμάτων συμπεριλαμβανομένων:
 - του γεωγραφικού εντοπισμού της τοποθεσίας (γεωγραφικό πλάτος και μήκος),
 - της ημερομηνίας δειγματοληψίας,
 - του προτύπου χρήσεως (π.χ. γεωργικό έδαφος, δάσος, κλπ.);
 - του βάθους δειγματοληψίας,
 - της περιεκτικότητας σε άμμο/προσχωσιγενή/άργιλο,
 - των τιμών pH (σε 0.01 M CaCl₂);
 - της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα,
 - της περιεκτικότητας σε οργανική ύλη,
 - της περιεκτικότητας σε άζωτο,
 - της σχέσης C/N,
 - της κατιονταλλακτικής ικανότητας (mmol/kg);
 - κάθε στοιχείου σχετικού με τη συλλογή και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων,
 - όπου χρειάζεται, κάθε σχετικού στοιχείου για την ερμηνεία της προσρόφησης-εκρόφησης της υπό δοκιμή ουσίας,
 - αναφοράς των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό κάθε παραμέτρου.
- πληροφορίες για την υπό δοκιμή ουσία, όπου απαιτείται,
- η θερμοκρασία των πειραμάτων,
- οι συνθήκες φυγοκέντρωσης,
- η αναλυτική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας,
- αιτιολόγηση της τυχόν χρήσεως διαλυτοποιητικού μέσου για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας,
- επεξηγήσεις για τις τυχόν διορθώσεις που έγιναν στους υπολογισμούς,
- δεδομένα σύμφωνα με το έντυπο (παράρτημα 6) και γραφικές παραστάσεις,
- κάθε πληροφορία και παρατήρηση που είναι χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών.

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
2. Fränze O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
12. Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
13. Calvet R., (1980) "Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29-35.
16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), "Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schiefferrstein R.H., (1965), "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, 185-190.
18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.
19. Russell M.H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

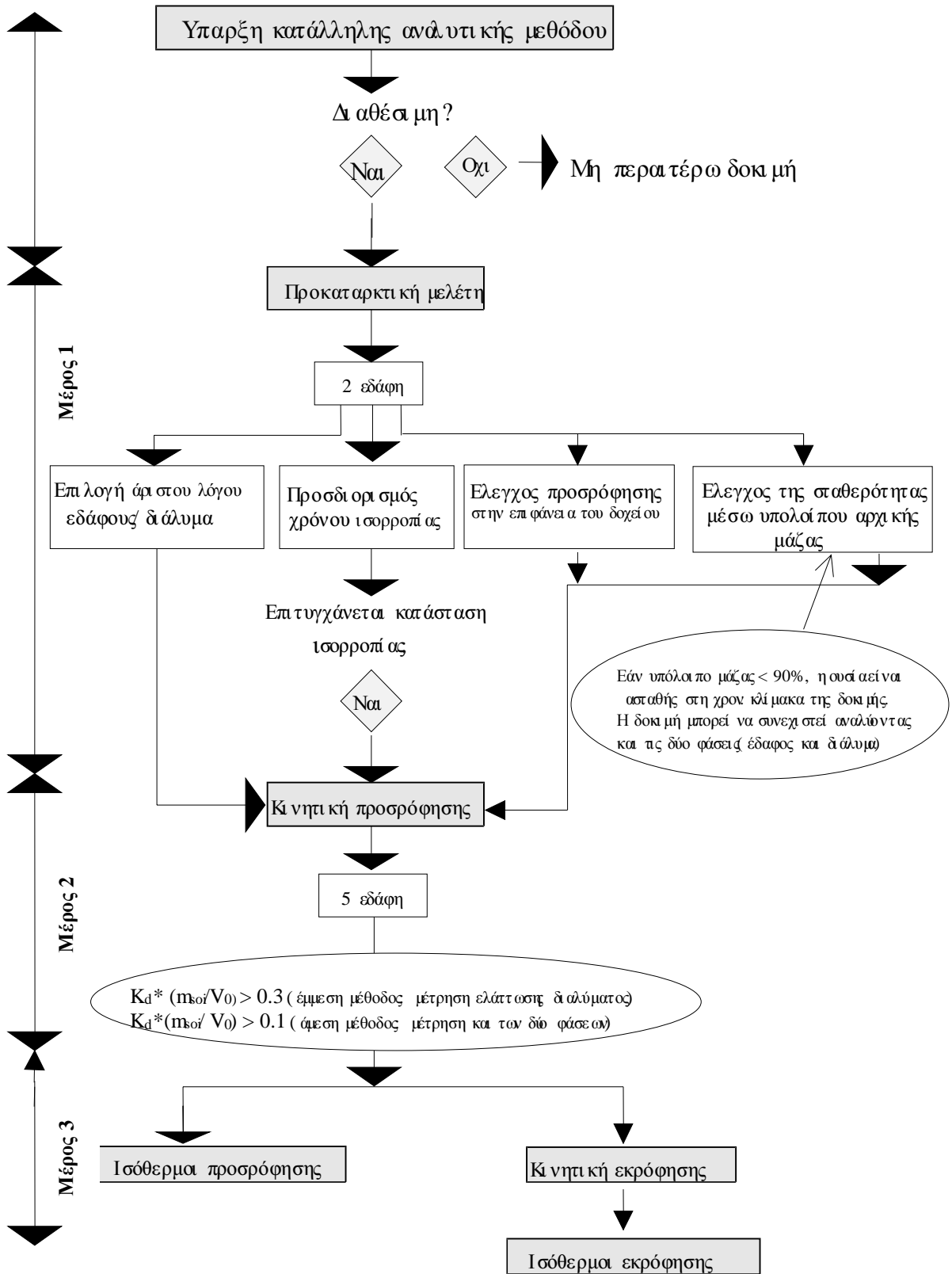
21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Furninge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, 269-273.
23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, 45-52.
24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.
25. Osgerby J.M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, 247-258.
26. Guth J.A., (1972), "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143-154.
27. Hamaker J.W., (1975), "The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
28. Helling C.S., (1971), "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732-210.
29. Hamaker J.W., (1972), "Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.
30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, 37-44.
31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
32. Gustafson D.I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339-357.
33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, 340-350.
34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, 389-395.
35. Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), "Sorpton estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80-101,
36. Lambert S.M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.
37. Hance R.J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.
38. Briggs G.G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 1288.
39. Briggs G.G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
40. Sabljic A., (1984), "Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.
41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), "Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". Residue Rev., 32, 29-92.
42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.
43. Karickhoff S.W., (1981) "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, 833-846.
44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), "Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.
45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). "Adsorption in organic chemicals" in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
46. Deli J., and Warren G.F., 1971, "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". *Weed Science*, Vol. 23, 454-457.
48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) "Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International Atomic Energy Agency, Vienna.
49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), "Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase", CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
51. Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
53. ISO/ DIS 10381-1 Soil Quality -- Sampling -- Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques.
55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on safety of sampling.
56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality -- Sampling -- Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality -- Sampling -- Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) "Precision in pesticide adsorption measurements". *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, 353-354.
60. Grover R., and Hance R.J. (1970), "Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". *Soil Sci.*, 109-138.
61. Boesten, J.J.T.I, "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". *Pest. Sci.* 1990, 30, 31-41.
62. Boesten, J.J.T.I. "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106" *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26-29 April 1994.
63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), "Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". *Weed Res.* 21, 227-231.
64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), "Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". *J. Environ.Qual.*, 10(3), 382-386.
65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), "Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), 227-231.
66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 297-312.
67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), "Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". *Chemosphere*, 16(1), 109-116.
68. Lyman W.J. , Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). "Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". *Science*, Vol. 206, 831-832.

1. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), "Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38-42.
2. Karickhoff S.W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.
3. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), 319-322.
4. Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.
5. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test". *Chemosphere* 30 (7), 1373-1384.
6. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), 2341-2352.
7. Hance, R.J., (1967), "The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
8. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
9. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
10. Giles C.H., (1970), "Interpretation and use of sorption isotherms" in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.
11. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), "Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". *J. Chem. Soc.*, 3973-93.
12. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". *Ann. Agron.* 31: 239-251.
13. Bedbur E., (1996), "Anomalies in the Freundlich equation", *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
14. Guth, J.A., (1985), "Adsorption/desorption", in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
15. Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Σχήμα δοκιμής



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

Από τον πίνακα που ακολουθεί (84) καθίσταται προφανές ότι όταν η διαφορά μεταξύ της αρχικής μάζας ($m_0=110 \mu\text{g}$) και της μάζας ισορροπίας ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})=100\mu\text{g}$) της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα είναι πολύ μικρή, σφάλμα 5% στη μέτρηση της συγκέντρωσης ισορροπίας απολήγει σε σφάλμα 50% στον υπολογισμό της συγκέντρωσης της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας ($m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$) και 52.4% στον υπολογισμό του K_d .

$$\begin{aligned} \text{Ποσότητα εδάφους } m_{\text{soil}} &= 10 \text{ g} \\ \text{Όγκος διαλύματος } V_0 &= 100 \text{ cm}^3 \end{aligned}$$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ (μg)	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	R	$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ * (μg)	$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ * ($\mu\text{g g}^{-1}$)	R_{\ddagger}	K_d^*	R_{\ddagger}
	ΓΙΑ A = 9%							
$m_0 = 110 \mu\text{g or } C_0=1. 100 \mu\text{g / cm}^3$	100	1.000	Αληθής τιμή	10	1.00	Αληθής τιμή	1	
	101	1.010	1%	9	0.90	10%	0.891	10.9%
	105	1.050	5%	5	0.50	50%	0.476	52.4%
	109	1.090	9%	1	0.10	90%	0.092	90.8%
	ΓΙΑ A = 55%							
$m_0 = 110 \mu\text{g or } C_0=1. 100 \mu\text{g / cm}^3$	50.0	0.500	Αληθής τιμή	60.0	6.00	Αληθής τιμή	12.00	
	50.5	0.505	1%	59.5	5.95	0.8%	11.78	1.8%
	52.5	0.525	5%	57.5	5.75	4.0%	10.95	8.8%
	55.0	0.550	10%	55.0	5.50	8.3%	10.00	16.7%
	ΓΙΑ A = 99%							
$m_0 = 110 \mu\text{g or } C_0=1. 100 \mu\text{g / cm}^3$	1.100	0.011	Αληθής τιμή	108.9	10.89	Αληθής τιμή	990	
	1.111	0.01111	1%	108.889	10.8889	0.01%	980	1.0%
	1.155	0.01155	5%	108.845	10.8845	0.05%	942	4.8%
	1.21	0.0121	10%	108.790	10.8790	0.10%	899	9.2%

$$* m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), \quad C_s^{ads}(eq) = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] V_0}{m_{soil}}, \quad K_d = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στην εδαφική φάση εν ισορροπία, μg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση εν ισορροπία, μg

$C_s^{ads}(eq)$ = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην εδαφική φάση εν ισορροπία, μg g⁻¹

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = κ.ο. συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση εν ισορροπία, μg cm⁻³

R = αναλυτικό σφάλμα στον προσδιορισμό της $m_{aq}^{ads}(eq)$

R_ε = υπολογισθέν σφάλμα λόγω του αναλυτικού σφάλματος R.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΟΥ K_d

1. Οι τεχνικές εκτίμησης επιτρέπουν την πρόβλεψη του K_d με βάση συσχετισμούς με, π.χ., τιμές P_{ow} (12)(39)(63-68), δεδομένα υδατοδιαλυτότητας (12)(19)(21)(39)(68-73), ή δεδομένα πολικότητας προερχόμενα από εφαρμογή HPLC ανάστροφης φάσης (74-76). Όπως φαίνεται στους πίνακες 1 και 2, από τις εξισώσεις αυτές υπολογίζονται οι K_{oc} ή K_{om} και στη συνέχεια, εμμέσως, ο K_d από τις εξισώσεις:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (cm^3 g^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1.724} \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (cm^3 g^{-1})$$

2. Η ιδέα αυτών των συσχετισμών βασίζεται σε δύο παραδοχές: (1) Η προσρόφηση μιας ουσίας επηρεάζεται κυρίως από την οργανική ύλη του εδάφους και (2) οι εμφανιζόμενες αλληλεπιδράσεις είναι κυρίως μη πολικές. Ως εκ τούτου, οι συσχετισμοί αυτοί: (1) δεν εφαρμόζονται, ή εφαρμόζονται μόνο σε κάποιο βαθμό, σε πολικές ουσίες και (2) δεν εφαρμόζονται σε περιπτώσεις όπου η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ύλη είναι πολύ μικρή (12). Επιπλέον, αν και μεταξύ P_{ow} και προσρόφησης (19) βρέθηκαν ικανοποιητικοί συσχετισμοί, δεν μπορούμε να πούμε το ίδιο για τη σχέση μεταξύ υδατοδιαλυτότητας και βαθμού προσρόφησης (19)(21). Μέχρι τώρα, οι διάφορες μελέτες έχουν αποδειχθεί πολύ αντιφατικές.

3. Ορισμένα παραδείγματα συσχετισμών μεταξύ του συντελεστή προσρόφησης και του συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού, καθώς επίσης και της υδατοδιαλυτότητας δίδονται στους πίνακες 1 και 2, αντιστοίχως.

Πίν. 1. Παραδείγματα συσχετισμών μεταξύ συντελεστή κατανομής προσρόφησης και συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού. Για περαιτέρω παραδείγματα, βλ. (12) (68).

Ουσίες	Συσχετισμοί	Συγγραφείς
Υποκατεστημένες ουρίες	$\log K_{om} = 0.69 + 0.52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Αρωματικές χλωριωμένες ενώσεις	$\log K_{oc} = -0.779 + 0.904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Διάφορα γεωργικά φάρμακα	$\log K_{om} = 4.4 + 0.72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Αρωματικοί υδρογονάνθρακες	$\log K_{oc} = -2.53 + 1.15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Πίνακας 2. Παραδείγματα συσχετισμών μεταξύ του συντελεστή κατανομής προσρόφησης και υδατοδιαλυτότητας. Για περαιτέρω παραδείγματα βλ. (68) (69).

Ενώσεις	Συσχετισμοί	Συγγραφείς
Διάφορα γεωργικά φάρμακα	$\log K_{om} = 3.8 - 0.561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Αλειφατικές, αρωματικές χλωριωμένες ενώσεις	$\log K_{om} = (4.040 \pm 0.038) - (0.557 \pm 0.012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α-ναφθόλη	$\log K_{oc} = 4.273 - 0.686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Κυκλικές, αλειφατικές αρωματικές ενώσεις	$\log K_{oc} = -1.405 - 0.921 \log S_w - 0.00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Διάφορες ενώσεις	$\log K_{om} = 2.75 - 0.45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ

1. Ο χρόνος φυγοκέντρωσης δίνεται από τον ακόλουθο τύπο, υποτιθεμένου ότι τα σωματίδια είναι σφαιρικά:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Για απλουστευτικούς λόγους, όλες οι παράμετροι εκφράζονται σε μονάδες SI (g, cm).

όπου:

ω	=	ταχύτητα περιστροφής (=2 π rpm/60), rad s ⁻¹
rpm	=	στροφές ανά λεπτό
η	=	ιξώδες διαλύματος, g s ⁻¹ cm ⁻¹
r_p	=	ακτίνα σωματιδίων, cm
ρ_s	=	πυκνότητα εδάφους, g cm ⁻³
ρ_{aq}	=	πυκνότητα διαλύματος, g cm ⁻³
R_t	=	απόσταση από το κέντρο του στροφείου της φυγοκέντρου μέχρι την άνωεπιφάνεια του διαλύματος στο σωλήνα φυγοκέντρωσης, cm
R_b	=	απόσταση από το κέντρο του στροφείου της φυγοκέντρου μέχρι τον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρωσης, cm
$R_b - R_t$	=	μήκος του μίγματος εδάφους/διαλύματος στο σωλήνα φυγοκέντρωσης, cm.

Στην πράξη, για να διασφαλιστεί πλήρης διαχωρισμός, χρησιμοποιούνται διπλάσιοι από τους υπολογιζόμενους χρόνους.

2. Η εξίσωση (1) μπορεί να απλοποιηθεί περαιτέρω αν θεωρήσουμε το ιξώδες (η) και την πυκνότητα (ρ_{aq}) του διαλύματος ως ίσα με το ιξώδες και την πυκνότητα του νερού στους 25 °C. Έτσι, $\eta = 8.95 \times 10^{-3}$ g s⁻¹ cm⁻¹ και $\rho_{aq} = 1.0$ g.cm⁻³.

Τότε, ο χρόνος φυγοκέντρωσης δίνεται από την εξίσωση (2):

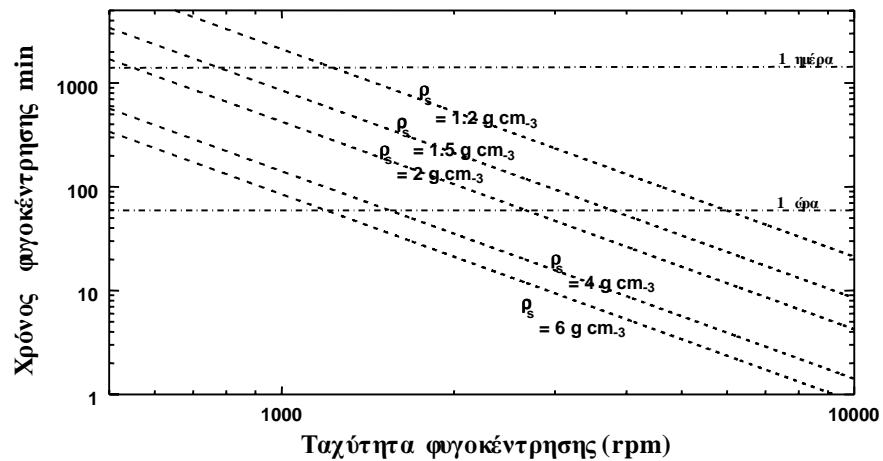
$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. Από την εξίσωση (2) καθίσταται προφανές ότι για τον ορισμό των συνθηκών φυγοκέντρωσης, δηλ. του χρόνου (t) και της ταχύτητας (rpm), προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός σωματιδίων με συγκεκριμένο μέγεθος (στην περίπτωσή μας 0.1 μm ακτίνα), δύο παράμετροι παίζουν σημαντικό ρόλο: (1) η πυκνότητα του εδάφους και (2) το μήκος του μίγματος στο σωλήνα φυγοκέντρωσης ($R_b - R_t$), δηλ. η απόσταση που καλύπτει ένα σωματίδιο εδάφους από την άνω επιφάνεια του διαλύματος μέχρι τον πυθμένα του σωλήνα. Προφανώς, για συγκεκριμένο όγκο, το μήκος του μίγματος στο σωλήνα εξαρτάται από το τετράγωνο της ακτίνας του σωλήνα.

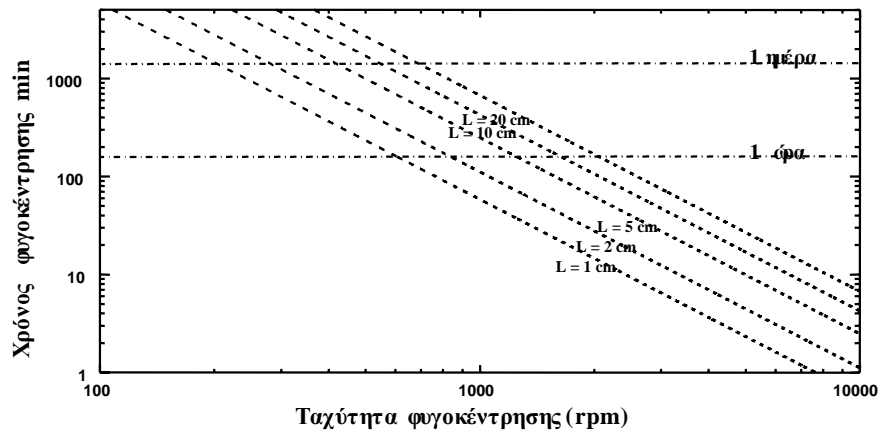
4. Στην εικ. 1 παρίστανται οι μεταβολές του χρόνου φυγοκέντρωσης (t) συναρτήσει της ταχύτητας φυγοκέντρωσης (rpm) για διάφορες πυκνότητες εδάφους (ρ_s) (Εικ.1α) και διάφορα μήκη του μίγματος στους σωλήνες φυγοκέντρωσης (Εικ.2α). Από την Εικ. 1α είναι εμφανής η επίδραση της εδαφικής πυκνότητας. Για παράδειγμα, για μία κλασσική φυγοκέντρωση 3000 rpm ο χρόνος φυγοκέντρωσης είναι περίπου 240 min για εδαφική πυκνότητα 1.2 g cm⁻³, ενώ για 2.0 g cm⁻³ είναι μόνον 50 min. Ομοίως, από την Εικ.1β, για μία κλασσική φυγοκέντρωση 3000 rpm ο χρόνος φυγοκέντρωσης είναι περίπου 50 min για μήκος μίγματος 10 cm και μόνον 7 min για μήκος 1 cm. Εντούτοις, παίζει σημαντικό ρόλο το να βρεθεί η άριστη σχέση μεταξύ φυγοκέντρωσης που απαιτεί το λιγότερο δυνατό μήκος και εύκολου χειρισμού για τον ερευνητή στο διαχωρισμό των φάσεων μετά τη φυγοκέντρωση.

5. Περαιτέρω, όταν ορίζονται οι πειραματικές συνθήκες για το διαχωρισμό των φάσεων εδάφους/διαλύματος, είναι σημαντικό να εξεταστεί η πιθανή ύπαρξη μιας τρίτης “ψευδοφάσεως”, των κολλοειδών. Τα σωματίδια αυτά, με μέγεθος μικρότερο από 0.2 μm , μπορεί να έχουν σημαντική επίπτωση στον όλο μηχανισμό προσρόφησης μιας ουσίας σε ένα εδαφικό εναιώρημα. Όταν εκτελείται φυγοκέντρωση όπως περιγράφεται ανωτέρω, τα κολλοειδή παραμένουν στην υδατική φάση και υποβάλλονται σε ανάλυση μαζί με την υδατική φάση. Έτσι, χάνονται οι πληροφορίες για την επίπτωσή τους.

Εάν το εργαστήριο διαθέτει εξοπλισμό υπερφυγοκέντρωσης ή υπερδιήθησης, η προσρόφηση/εκρόφιση μιας ουσίας στο έδαφος μπορεί να μελετηθεί περισσότερο σε βάθος, συμπεριλαμβανομένων και στοιχείων για την προσρόφιση της ουσίας στα κολλοειδή. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να εφαρμόζεται υπερφυγοκέντρωση με 60,000 rpm/min ή υπερδιήθηση με πορώδες φίλτρου 100,000 Daltons για το διαχωρισμό των τριών φάσεων, έδαφος, κολλοειδή και διάλυμα. Το πρωτόκολλο δοκιμής θα πρέπει επίσης να τροποποιείται αναλόγως, ώστε και οι τρεις φάσεις να υποβληθούν σε ανάλυση για την ουσία.



Εικ. 1α. Μεταβολές χρόνου φυγοκέντρωσης (t) συναρτήσει της ταχύτητας φυγοκέντρωσης (rpm) για διάφορες πυκνότητες εδάφους (ρ_s). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και $d_{\text{aq}} = 1.0 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ στους $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

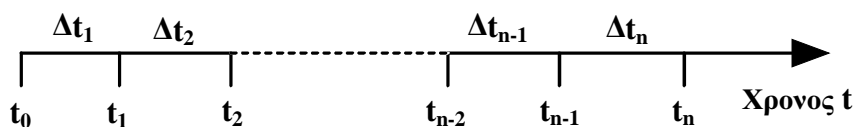


Εικ.1β. Μεταβολές του χρόνου φυγοκέντρωσης (t) συναρτήσει της ταχύτητας φυγοκέντρωσης (rpm) για διάφορα μήκη του μίγματος στο σωλήνα φυγοκέντρωσης ($R_b - R_t$) = L ; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1.0 \text{ g.cm}^{-3}$ στους $25 \text{ }^\circ\text{C}$ και $\rho_s = 2.0 \text{ g cm}^{-3}$.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ A (%) ΚΑΙ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ D (%)

Το χρονικό σχήμα της διαδικασίας είναι:



Για όλους τους υπολογισμούς, υποτίθεται ότι η υπό δοκιμή ουσία είναι σταθερή και δεν προσροφάται σε μεγάλο βαθμό στα τοιχώματα του δοχείου.

ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ A (A%)

α) Παράλληλη μέθοδος

Η ποσοστιαία προσρόφηση υπολογίζεται για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα (i) σε κάθε χρονική στιγμή (t_i), σύμφωνα με την εξίσωση:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)^4$$

Οι όροι της εξίσωσης αυτής μπορούν να υπολογιστούν ως εξής:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

όπου:

A_{t_i} = ποσοστιαία προσρόφηση (%) τη χρονική στιγμή t_i

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος τη χρονική στιγμή t_i που εκτελείται η ανάλυση (μg);

m_0 = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοκιμαστικό σωλήνα, στην αρχή της δοκιμής (μg);

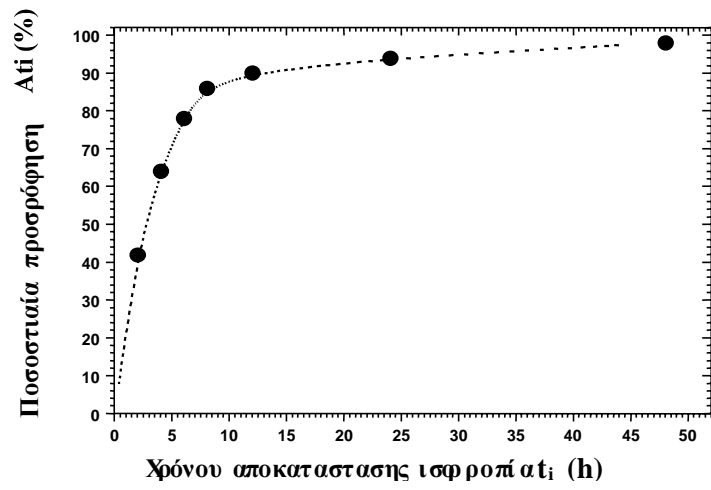
C_0 = αρχική κ.ο. συγκέντρωση του υπό δοκιμή διαλύματος που είναι σε επαφή με το έδαφος (μg cm^{-3});

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ = κ.ο. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση τη χρονική στιγμή t_i κατά την οποία εκτελείται η ανάλυση (μg cm^{-3}). Η συγκέντρωση αυτή προσδιορίζεται αναλυτικώς λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές που βρέθηκαν στα τυφλά.

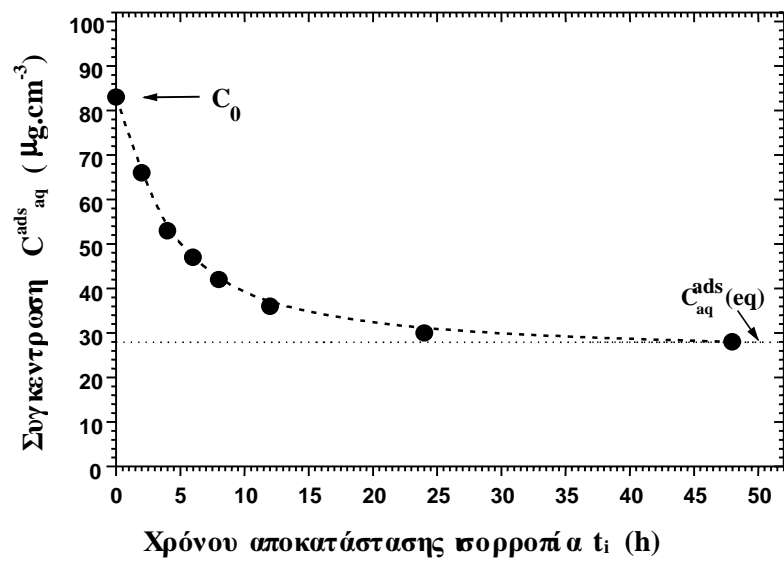
V_0 = αρχικός όγκος του υπό δοκιμή διαλύματος σε επαφή με το έδαφος (cm^3).

Οι τιμές του ποσοστού προσρόφησης A_{t_i} ή $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ παριστάνονται γραφικώς συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίζεται ο χρόνος μετά τον οποίο επιτυγχάνεται ισορροπία ρόφησης. Παραδείγματα τέτοιων καμπυλών εμφανίζονται στις εικ. 1 και 2 αντιστοίχως.

⁴ Εξισώσεις εφαρμοζόμενες τόσο στην άμεση όσο και στην έμμεση μέθοδο. Όλες οι υπόλοιπες εξισώσεις εφαρμόζονται μόνον στην έμμεση μέθοδο.



Εικ. 1. Καμπύλη ισορροπίας προσρόφισης



Εικ. 2. Κ.ο. συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση (C_{aq}) συναρτήσει του χρόνου

β) Εν σειρά μέθοδος

Στις εξισώσεις που ακολουθούν λαμβάνεται υπόψη ότι η διαδικασία προσρόφησης εκτελείται με μετρήσεις της υπό δοκιμή ουσίας σε μικρές ποσότητες της υδατικής φάσης σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα

- Κατά τη διάρκεια κάθε χρονικού διαστήματος, η ποσότητα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας υπολογίζεται ως εξής:

-για το πρώτο χρονικό διάστημα $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

για το δεύτερο χρονικό διάστημα $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

-για το τρίτο χρονικό διάστημα $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

-για το νιοστό χρονικό διάστημα $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

- Το ποσοστιαία προσρόφηση σε κάθε χρονικό διάστημα, $A_{\Delta t_i}$, υπολογίζεται

χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8)^5$$

ενώ το ποσοστιαία προσρόφηση (A_{t_i}) τη χρονική στιγμή t_i δίνεται από την εξίσωση:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (95)$$

⁵ Εξισώσεις εφαρμοζόμενες τόσο στην άμεση όσο και στην έμμεση μέθοδο. Όλες οι υπόλοιπες εξισώσεις εφαρμόζονται μόνον στην έμμεση μέθοδο.

Οι τιμές της προσρόφησης A_{t_1} ή $A_{\Delta t_1}$ (ανάλογα με τις ανάγκες της μελέτης) παριστάνονται γραφικώς συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίζεται ο χρόνος μετά τον οποίο επιτυγχάνεται ισορροπία ρόφησης.

- Κατά το χρόνο ισορροπίας t_{eq} :

-η μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας είναι:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^5$$

-η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα είναι:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^5$$

-και το ποσοστιαία προσρόφηση στην ισορροπία είναι:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)^5$$

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται παραπάνω ορίζονται ως:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας κατά τη διάρκεια των χρονικών διαστημάτων $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ αντιστοίχως (μg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$ = μάζα της ουσίας που μετριέται σε όγκο v_a^A τις χρονικές στιγμές t_1, t_2, \dots, t_n αντιστοίχως (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας κατά την ισορροπία προσρόφησης (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = μάζα της ουσίας στο διάλυμα κατά την ισορροπία προσρόφησης (μg);

v_a^A (cm³); = όγκος της ποσότητας στην οποία μετριέται η υπό δοκιμή ουσία

$A_{\Delta t_1}$ = ποσοστιαία προσρόφηση που αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα Δt_i (%);

A_{eq} = ποσοστιαία προσρόφηση κατά την ισορροπία προσρόφησης, (%).

ΕΚΡΟΦΗΣΗ D (%)

Ως χρόνος εκκίνησης του πειράματος κινητικής εκρόφησης t_0 λαμβάνεται η χρονική στιγμή κατά την οποία ο μέγιστος ανακτημένος όγκος του διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (μετά την επίτευξη ισορροπίας προσρόφησης) αντικαθίσταται από ίσο όγκο διαλύματος 0.01 M CaCl₂.

α) Παράλληλη μέθοδος

Τη χρονική στιγμή t_i , μετριέται η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση που λαμβάνεται από το σωλήνα i (V_F^i) και η προσροφημένη μάζα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_F^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Κατά την ισορροπία εκρόφησης $t_i=t_{eq}$ και συνεπώς $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Η μάζα της προσροφουμένης υπό δοκιμή ουσίας κατά τη χρονική περίοδο (Δt_i) δίνεται από την εξίσωση:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Η ποσοστιαία εκρόφηση υπολογίζεται:

- τη χρονική στιγμή t_i από την εξίσωση:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

- και κατά τη διάρκεια χρονικού διαστήματος (Δt_i) από την εξίσωση:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

όπου:

D_{t_i} = ποσοστιαία εκρόφηση τη χρονική στιγμή t_i , (%)

$D_{\Delta t_i}$ = ποσοστιαία εκρόφηση που αντιστοιχεί σε χρονικό διάστημα Δt_i , (%)

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = μάζα της προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας τη χρονική στιγμή t_i , (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = μάζα της προσροφουμένης υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια χρονικού διαστήματος Δt_i , (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που ανευρίσκεται αναλυτικώς τη χρονική στιγμή t_i σε όγκο διαλύματος V_F^i , που λαμβάνεται για ανάλυση, (μg);

m_{aq}^A = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που περισεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης, (μg);

$$m_{aq}^A = m_{ads}^{eq} \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης (μg)

V_R = όγκος του υπερκειμένου υγρού που απομακρύνεται από το σωλήνα μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται από τον ίδιο όγκο διαλύματος 0.01 M CaCl₂, (cm³)

V_T^i = όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα (i) για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας στο πείραμα της κινητικής εκρόφησης, (cm³).

Οι τιμές εκρόφησης D_{t_i} ή $D_{\Delta t_i}$ (ανάλογα με τις ανάγκες της μελέτης) παρίστανται γραφικώς συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίζεται ο χρόνος μετά τον οποίο αποκαθίσταται ισορροπία εκρόφησης.

β) Εν σειρά μέθοδος

Στις εξισώσεις που ακολουθούν λαμβάνεται υπόψη ότι η διαδικασία προσρόφησης, που προηγήθηκε, πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε μικρές ποσότητες (v_a^A) της υδατικής φάσης (εν σειρά μέθοδος στην ενότητα “Εκτέλεση της δοκιμής” 1.9.). Υποτίθεται ότι: α) ο όγκος του υπερκειμένου υγρού που απομακρύνθηκε από το σωλήνα μετά το πείραμα κινητικής εκρόφησης αντικαταστάθηκε από τον ίδιο όγκο διαλύματος 0.01 M CaCl₂ (V_R) και β) ο συνολικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος (V_T) κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης παραμένει σταθερός και δίνεται από την εξίσωση:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

Τη χρονική στιγμή t_i :

- Σε μικρή ποσότητα (v_a^D) μετριέται η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας και η προσροφημένη μάζα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

- Κατά την ισορροπία εκρόφησης $t_i = t_{eq}$ και συνεπώς $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

- Η ποσοστιαία εκρόφηση D_{t_i} υπολογίζεται με την ακόλουθη εξίσωση:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (20)$$

Σε χρονικό διάστημα (Δt_i):

- Κατά τη διάρκεια κάθε χρονικού διαστήματος η ποσότητα της εκροφουμένης ουσίας υπολογίζεται ως εξής:

— για το πρώτο χρονικό διάστημα $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \quad \text{and} \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— για το δεύτερο χρονικό διάστημα $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) \quad \text{και}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - [m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)] \quad (22)$$

— για το νιοστό χρονικό διάστημα $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \right]$$

και $m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ (23)

Τελικά, η ποσοστιαία εκρόφηση σε κάθε χρονικό διάστημα, $D_{\Delta t_i}$, υπολογίζεται με την ακόλουθη εξίσωση:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

ενώ η ποσοστιαία εκρόφηση D_{t_i} τη χρονική στιγμή t_i δίνεται από την εξίσωση:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

όπου οι ανωτέρω χρησιμοποιούμενες παράμετροι ορίζονται ως:

$m_s^{des}(\Delta t_1), m_s^{des}(\Delta t_2), \dots, m_s^{des}(\Delta t_n)$ = μάζα της ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος μετά τα χρονικά διαστήματα $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ αντιστοίχως (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1), m_{aq}^{des}(\Delta t_2), \dots, m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = μάζα της εκροφουμένης υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια των χρονικών διαστημάτων $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ αντιστοίχως (μg);

$m_m^{des}(t_1), m_m^{des}(t_2), \dots, m_m^{des}(t_n)$

= μάζα της ουσίας που ανευρίσκεται σε ποσότητα (v_a^D) κατά τις χρονικές στιγμές t_1, t_2, \dots, t_n , αντιστοίχως (μg);

V_T

= συνολικός όγκος της σε επαφή με το έδαφος υδατικής φάσης κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά μέθοδο (cm^3);

m_{aq}^A

= μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που περισσεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης, (μg);

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \quad (26)$$

V_R

= όγκος του υπερκειμένου υγρού που απομακρύνεται από το σωλήνα μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται από τον ίδιο όγκο 0.01 M CaCl_2 , (cm^3);

v_a^D

= όγκος της ποσότητας που δειγματίζεται για αναλυτικούς σκοπούς από το σωλήνα (i), κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά μέθοδο, (cm^3);

$$v_a^D \leq 0.02 \cdot V_T \quad (27)$$

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6

ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ-ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΣΕ ΕΛΑΦΗ: ΦΥΛΛΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C, 12 h):.....%

Θερμοκρασία:.....°C

Καταλληλότητα της αναλυτικής μεθόδου

Ζυγισθέν έδαφος	g	
?Έδαφος: ξηρά μάζα	g	
?Όγκος διαλύματος CaCl ₂	cm ³	
Ονομαστική συγκέντρωση τελικού διαλύματος	μg cm ⁻³	
Συγκέντρωση τελικού διαλύματος βάσει αναλύσεως	μg cm ⁻³	

Αρχή της χρησιμοποιηθείσας αναλυτικής μεθόδου:

Διακρίβωση της αναλυτικής μεθόδου:

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C, 12 h):.....%

Θερμοκρασία:.....°C

Ακολουθούμενη αναλυτική μεθοδολογία: ?Εμμεση Παράλληλη Εν σειρά
 ?Αμεση

Δοκιμή προσρόφησης: Δείγματα δοκιμής

	Σύμβολο	Μονάδες	Χρόνος ισορροπίας	Χρόνος ισορροπίας	Χρόνος ισορροπίας	Χρόνος ισορροπίας
Σωλήνας αριθ.						
Ζυγισθέν έδαφος	-	g				
Έδαφος: ξηρά μάζα	m_{soil}	g				
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος (υπολογισθείς)	V_{WS}	cm^3				
Όγκος 0.01 M CaCl ₂ για εξισορρόπηση του εδάφους		cm^3				
Όγκος αρχικού διαλύματος		cm^3				
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος	V_0	cm^3				
Αρχική συγκέντρωση Διάλυμα δοκιμής	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$				
Μάζα υπό δοκ. ουσίας στην αρχή της δοκιμής	m_0	μg				
Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρωση						
Έμμεση μέθοδος						
Παράλληλη μέθοδος						
Συγκέντρωση ουσίας στην υδατική φάση, λαμβανομένου υπόψη και του τυφλού	$C_{ad}^{ads}(t_i)$	$\mu g\ cm^{-3}$				
Εν σειρά μέθοδος						
Μετρηθείσα μάζα ουσίας σε όγκο V_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	μg				
Άμεση μέθοδος						
Μάζα υπό δοκ. ουσίας προσροφημένη στο έδαφος	$m_s^{ads}(t_i)$	μg				
Υπολογισμός προσρόφησης						
Προσρόφηση	A_{t_i}	%				
	$A_{\Delta t_i}$	%				
Μέση						
Συντελ. προσρόφησης	K_d	$cm^3\ g^{-1}$				
Μέσος						
Συντελ. προσρόφησης	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$				
Μέσος						

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα εδάφους (105 °C, 12 h):.....%

Θερμοκρασία:.....°C

Δοκιμή προσρόφησης: τυφλά και μάρτυρας

	Σύμβολο	Μονάδες	Τυφλό		Τυφλό		Μάρτυρας	
Σωλήνας αριθ.								
Ζυγισθέν έδαφος	-	g					0	0
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος (υπολογισθείς)		cm ³					-	-
Όγκος προστεθέντος διαλύματος 0.01 M CaCl ₂		cm ³						
Όγκος του προστεθέντος αρχικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας		cm ³	0	0				
Συνολικός όγκος υδατικής φάσεως (υπολογισθείς)		cm ³					-	-
Αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση		μg cm ⁻³						
Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρωση								
Συγκέντρωση στην υδατική φάση		μg cm ⁻³						

Παρατήρηση: Εφόσον χρειάζεται, προσθέστε στήλες

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C 12 h):.....%

Θερμοκρασία:.....°C

Υπόλοιπο μάζας

	Σύμβολο	Μονάδες				
Σωλήνας αριθ.						
Ζυγισθέν έδαφος	-	g				
Έδαφος: ξηρά μάζα	m_{Soil}	g				
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος (υπολογισθείς)	V_{WS}	ml				
Όγκος 0.01 M CaCl ₂ για την εξισορρόπηση του εδάφους		ml				
Όγκος αρχικού διαλύματος		cm ³				
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος	V_0	cm ³				
Αρχική συγκέντρωση διαλύματος δοκιμής	C_0	μg cm ⁻³				
Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας	-	h				
Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρωση						
Συγκ. υπό δοκιμή ουσίας στην υδατ. φάση σε ισορροπία προσρόφησης, λαμβανομένου υπόψη και του τυφλού	$C_{aq}^{ads}(eq)$	μg cm ⁻³				
Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας	t_{eq}	h				
1η αραιώση με διαλύτη						
Απομακρυνθείς όγκος υδατικής φάσης	V_{rec}	cm ³				
Προσθεθείς όγκος διαλύτη	ΔV	cm ³				
1η εκχύλιση με διαλύτη						
Αναλύτης σήματος στο διαλύτη	S_{E1}	var.				
Συγκ. υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη	C_{E1}	μg cm ⁻³				
Μάζα ουσίας εκχυλισθείσα από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοχείου	M_{E1}	μg				
2η αραιώση με διαλύτη						
Απομακρυνθείς όγκος διαλύτη	ΔV_s	cm ³				
Προσθεθείς όγκος διαλύτη	$\Delta V'$	cm ³				
2η εκχύλιση με διαλύτη						
Αναλύτης σήματος στη φάση του διαλύτη	S_{E2}	var.				
Συγκ. υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη	C_{E2}	μg cm ⁻³				
Μάζα ουσίας εκχυλισθείσα από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοχείου	M_{E2}	μg				
Συνολική μάζα υπό δοκιμή ουσίας εκχυλισθείσα σε δύο στάδια	m_E					
Υπόλοιπη μάζα	MB	%				

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C, 12 h):.....%

Θερμοκρασία:.....°C

Ισόθερμοι προσρόφησης

	Σύμβολο	Μονάδες								
Σωλήνας αριθ.										
Ζυγισθέν έδαφος	-	g								
Έδαφος: ξηρά μάζα	E	g								
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος (υπολογισθείς)	V_{ws}	cm^3								
Όγκος 0.01 M CaCl ₂ για εξισορρόπηση του εδάφους		cm^3								
Όγκος προστεθέντος αρχικού διαλύματος		cm^3								
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος (υπολογισθείς)	V_0	cm^3								
Συγκέντρωση διαλύματος	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας	-	h								
Έπαιτα από ανάδευση και φυγοκέντρωση										
Συγκ. ουσίας στην υδατική φάση, λαμβανομένου υπόψη και του τυφλού	$C_{aq}^{ads}\ (eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Θερμοκρασία		°C								
Προσροφ. μάζα ανά μονάδα εδάφους	$C_s^{ads}\ (eq)$	$\mu g\ g^{-1}$								

Αναγωγή:

τιμή K_F^{ads} :

τιμή $1/n$:

συντελεστής αναγωγής r^2 :

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα εδάφους (105 °C, 12 h):.....%

Θερμοκρασία:.....°C

Ακολουθηθείσα μεθοδολογία ανάλυσης: ?Εμμεση Παράλληλη Εν σειρά

Δοκιμή εκρόφησης

	Σύμβολο	Μονάδες	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα
Σωλήνας αριθ. προερχόμενος από το στάδιο προσρόφησης						
Μάζα ουσίας προσροφ. στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης	$m_{s}^{ads}(eq)$	μg				
Απομακρυνθείς όγκος υδατ. φάσης, αντικατασταθείς από 0.01 M CaCl ₂	V_R	cm ³				
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης	PM V_0	cm ³				
Σε επαφή με το έδαφος	SM V_T	cm ³				
Μάζα ουσίας που περισεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης	m_{aq}^A	μg				
Κινητική εκρόφησης						
Μετρηθείσα μάζα εκροφημένης από το έδαφος ουσίας τη χρονική στιγμή t_i	$m_m^{des}(t_i)$	μg				
Όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα (i) για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας	PM v_i^i	cm ³				
	SM v_a^D	cm ³				
Μάζα ουσίας εκροφημένη από το έδαφος τη χρονική στιγμή t_i (υπολογισθείσα)	$m_{aq}^{des}(t_i)$	μg				
Μάζα ουσίας εκροφουμένη από το έδαφος κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος Δt_i (υπολογισθείσα)	$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	μg				
Ποσοστιαία εκρόφηση						
Εκρόφηση τη χρονική στιγμή t_i	D_{t_i}	%				
Εκρόφηση κατά το χρονικό διάστημα Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Φαινομενικός συντελεστής εκρόφησης	K_{des}					

PM: Παράλληλη μέθοδος
SM: Εν σειρά μέθοδος

C.19. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ (K_{oc}) ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΑΣΠΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΝΟΜΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αναπαραγωγή της OECD TG121 (2000).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ροφητική συμπεριφορά των ουσιών στο έδαφος ή στις λάσπες των υπονόμων μπορεί να περιγραφεί μέσω παραμέτρων που προσδιορίζονται πειραματικά με τη μέθοδο δοκιμής C18. Μια σημαντική παράμετρος είναι ο συντελεστής προσροφήσεως που ορίζεται ως ο λόγος της συγκεντρώσεως της ουσίας στο έδαφος/λάσπη προς τη συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας προσροφήσεως. Ο τυποποιημένος σε σχέση με την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του εδάφους συντελεστής προσροφήσεως K_{oc} είναι ένας χρήσιμος δείκτης της συνδετικής ικανότητας μιας χημικής ουσίας με την οργανική ύλη του εδάφους και τη λάσπη των υπονόμων που επιτρέπει να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ διαφόρων χημικών ουσιών. Η παράμετρος αυτή μπορεί να υπολογιστεί μέσω συσχετισμού με την υδατοδιαλυτότητα και το συντελεστή κατανομής n -οκτανόλης/νερό (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Στην πειραματική μέθοδο που περιγράφεται στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται HPLC για τον υπολογισμό του συντελεστή προσρόφησης K_{oc} στο έδαφος και στη λάσπη των υπονόμων (8). Τα αποτελέσματα είναι μεγαλύτερης αξιοπιστίας από εκείνα που λαμβάνονται με υπολογισμούς QSAR (9). Ως εκτιμητική μέθοδος, δεν μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως τα πειράματα ισορροπίας παρτίδας που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο δοκιμής C18. Εντούτοις, η υπολογιζόμενη K_{oc} μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για την επιλογή κατάλληλων παραμέτρων δοκιμής για μελέτες προσρόφησης/εκρόφησης σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμής C.18 με υπολογισμό του K_d (συντελεστής κατανομής) ή K_f (συντελεστής προσρόφησης Freundlich) σύμφωνα με την εξίσωση 3 (βλ. σημείο 1.2).

ΟΡΙΣΜΟΙ

K_d : Ως συντελεστής κατανομής ορίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας C διαλελυμένης υπό δοκιμή ουσίας σε διφασικό σύστημα που αποτελείται από ένα ροφητικό μέσο (έδαφος ή λάσπη υπονόμων) και μια υδατική φάση. Είναι αδιάστατο μέγεθος όταν οι συγκεντρώσεις και στις δύο φάσεις εκφράζονται ως βάρος/βάρος. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση στην υδατική φάση δίνεται ως βάρος/όγκο, τότε οι μονάδες είναι $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$. Ο K_d μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις ιδιότητες του ροφητικού μέσου, ενώ μπορεί να εξαρτάται και από τη συγκέντρωση.

$$K_d = \frac{C_{\text{soil}}}{C_{\text{aq}}} \text{ or } \frac{C_{\text{sludge}}}{C_{\text{aq}}} \quad (1)$$

όπου:

C_{soil} = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
 C_{sludge} = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στη λάσπη σε κατάσταση ισορροπίας ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
 C_{aq} = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

K_f : Ως συντελεστής προσρόφησης Freundlich ορίζεται η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος ή στη λάσπη υπονόμων (x/m) όταν η συγκέντρωση σε κατάσταση ισορροπίας C_{aq} στην υδατική φάση είναι ίση με ένα. Οι μονάδες είναι μg·g⁻¹ ροφητικού μέσου. Η τιμή μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις ιδιότητες του ροφητικού μέσου.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

όπου:

x/m = ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας x (μg) προσροφημένη σε ποσότητα ροφητικού m (g) σε κατάσταση ισορροπίας

1/n = κλίση της ισοθέριμου προσρόφησης Freundlich

C_{aq} = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας (μg · ml⁻¹)

$$\text{Σε } C_{aq} = 1, \quad \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Συντελεστής κατανομής (K_d) ή συντελεστής κατανομής Freundlich (K_f) τυποποιημένος ως προς την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (f_{oc}) ενός ροφητικού. Στην περίπτωση, ιδιαίτερα, μη ιοντισμένων χημικών ουσιών, αποτελεί κατά προσέγγιση δείκτη του βαθμού προσρόφησης μεταξύ μιας ουσίας και του ροφητικού και παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης συγκρίσεων μεταξύ διαφόρων χημικών ουσιών. Ανάλογα με τις διαστάσεις των K_d και K_f, ο K_{oc} μπορεί να είναι αδιάστατος ή να έχει τις μονάδες ml · g⁻¹ ή μg · g⁻¹ οργανικής ύλης.

$$K_{oc} = K_d / f_{oc} \text{ (αδιάστατο ή ml} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad \text{ή} \quad K_f / f_{oc} \text{ (}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

Η σχέση μεταξύ K_{oc} και K_d δεν είναι πάντοτε γραμμική και έτσι, οι τιμές του K_{oc}, μπορεί να ποικίλουν από έδαφος σε έδαφος, η μεταβλητότητά τους όμως είναι μειωμένη σε μεγάλο βαθμό σε σύγκριση με τις τιμές των K_d ή K_f.

Ο συντελεστής προσροφήσεως (K_{oc}) εξάγεται από τον παράγοντα ικανότητας (k') χρησιμοποιώντας καμπύλη διακρίβωσης του log k' συναρτήσεως του K_{oc} των επιλεγμένων ενώσεων αναφοράς.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

όπου:

t_R : χρόνος κατακράτησης υπό δοκιμή ουσίας και ουσίας αναφοράς HPLC (λεπτά)

t₀ : νεκρός χρόνος HPLC (λεπτά) (βλ. σημείο 1.8.2).

P_{ow} : Ως συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού ορίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων της διαλελυμένης ουσίας σε n-οκτανόλη και νερό. Είναι αδιάστατο μέγεθος.

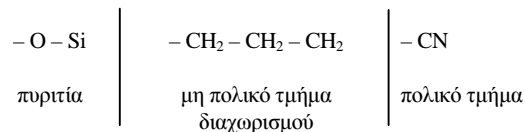
$$P_{ow} = \frac{C_{oc \text{ tan ol}}}{C_{aq}} \quad (= K_{ow}) \quad (5)$$

Πριν να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος, θα πρέπει να είναι γνωστά ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα και η σταθερά διαστάσεως (εάν υπάρχει). Χρήσιμο, επίσης, είναι να υπάρχουν στοιχεία για τη διαλυτότητα στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, για το συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού και για τα χαρακτηριστικά υδρόλυσης.

Για να συσχετιστούν τα μετρούμενα δεδομένα κατακράτησης HPLC μιας υπό δοκιμή ουσίας με το συντελεστή προσροφήσεως K_{oc} , πρέπει να χαραχθεί καμπύλη διακρίβωσης του $\log K_{oc}$ συναρτήσει του $\log k'$. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται έξι, κατ' ελάχιστο, σημεία αναφοράς, τουλάχιστον ένα πάνω και ένα κάτω από την αναμενόμενη τιμή της υπό δοκιμή ουσίας. Η ορθότητα (accuracy) της μεθόδου βελτιώνεται σημαντικά αν χρησιμοποιηθούν ουσίες αναφοράς με σύνταξη σχετική με εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας. Εφόσον δεν υπάρχουν διαθέσιμα τέτοια δεδομένα, επαφίεται στον χρήστη να επιλέξει τις κατάλληλες ουσίες διακρίβωσης. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να επιλέγεται ένα γενικότερο σύνολο συντακτικώς ετερογενών ουσιών. Ουσίες και τιμές K_{oc} που μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναγράφονται στο παράρτημα, στον πίνακα 1 για τη λάσπη υπονόμων και στον πίνακα 3 για το έδαφος. Τυχόν επιλογή άλλων ουσιών διακρίβωσης θα πρέπει να αιτιολογείται.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η HPLC εκτελείται σε αναλυτικές στήλες πληρωμένες με διαθέσιμη στο εμπόριο κυανοπροπυλική στερεά φάση, η οποία περιέχει λιπόφιλα και πολικά τμήματα. Χρησιμοποιείται μετρίως πολική στατική φάση με βάση πυριτία:



Η αρχή της μεθόδου είναι παρόμοια με εκείνη της μεθόδου δοκιμής A.8 (Συντελεστής κατανομής, μέθοδος HPLC). Η ουσία, καθώς διέρχεται διαμέσου της στήλης μαζί με την κινητή φάση, αλληλεπιδρά με τη στατική φάση. Λόγω της κατανομής μεταξύ κινητής και στατικής φάσης, η υπό δοκιμή ουσία καθυστερεί. Η διττή σύσταση της στατικής φάσης με πολικές και μη πολικές περιοχές επιτρέπει την αλληλεπίδραση πολικών και μη πολικών ομάδων ενός μορίου με παρόμοιο τρόπο όπως στην περίπτωση οργανικής ύλης ευρισκόμενης στο έδαφος ή σε λάσπη υπονόμων. Αυτό δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της σχέσης μεταξύ χρόνου κατακράτησης στη στήλη και συντελεστή προσρόφησης στην οργανική ύλη.

Το pH έχει σημαντική επίδραση στη ροφητική συμπεριφορά, ιδιαίτερα στην περίπτωση πολικών ουσιών. Στα γεωργικά εδάφη ή στις δεξαμενές εργοστασίων επεξεργασίας λυμάτων, το pH κυμαίνεται, κανονικά, μεταξύ pH 5,5 και 7,5. Για τις ιοντίσιμες ουσίες, θα πρέπει να πραγματοποιούνται δύο δοκιμές, σε ιοντισμένη και σε μη ιοντισμένη μορφή, σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα, στις περιπτώσεις όμως μόνο όπου το 10 % τουλάχιστον της υπό δοκιμή ενώσεως διίσταται σε περιοχή pH 5.5 έως 7.5.

Δεδομένου ότι, για την εκτίμηση, χρησιμοποιείται μόνον η σχέση μεταξύ της κατακράτησης στη στήλη HPLC και του συντελεστή προσρόφησης, δεν απαιτείται κάποια ποσοτική αναλυτική μέθοδος και αυτό που χρειάζεται μόνον είναι ο προσδιορισμός του χρόνου κατακράτησης. Εάν υπάρχει διαθέσιμο κάποιο κατάλληλο σύνολο ουσιών αναφοράς και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυπικές πειραματικές συνθήκες, η μέθοδος παρέχει ένα ταχύ και αποτελεσματικό τρόπο εκτίμησης του συντελεστή προσρόφησης K_{oc} .

ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μέθοδος HPLC μπορεί να εφαρμοστεί σε χημικές ουσίες (επισημασμένες ή μη) για τις οποίες υπάρχει διαθέσιμο κάποιο κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης (π.χ. φασματοφωτόμετρο, ανιχνευτής ραδιενέργειας) και οι οποίες είναι επαρκώς σταθερές κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ιδιαίτερα χρήσιμη μπορεί να αποδειχθεί για ουσίες που είναι δύσκολο να μελετηθούν σε άλλα πειραματικά συστήματα (δηλ. πτητικές ουσίες, ουσίες οι οποίες δεν είναι διαλυτές στο νερό σε επίπεδα συγκέντρωσης που να μπορούν να μετρηθούν αναλυτικά, ουσίες υψηλής συγγένειας με την επιφάνεια συστημάτων επώασης). Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μίγματα που παρέχουν μη διακριτές ζώνες εκλούσεως. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να δηλώνονται τα άνω και κάτω όρια των τιμών $\log K_{oc}$ των ενώσεων του υπό δοκιμή μίγματος.

Η ύπαρξη προσμειξεων μπορεί, μερικές φορές, να προκαλέσει προβλήματα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων HPLC, δεν έχει όμως ιδιαίτερη σημασία εφόσον η υπό δοκιμή ουσία μπορεί σαφώς να ταυτοποιηθεί αναλυτικά και να διαχωριστεί από τις προσμειξεις.

Η μέθοδος είναι έγκυρη για τις ουσίες που περιλαμβάνονται στον πίνακα 1 του παραρτήματος, ενώ εφαρμόζεται επίσης και σε διάφορες άλλες χημικές ουσίες που ανήκουν στις ακόλουθες χημικές τάξεις:

- αρωματικές αμίνες (π.χ. τριφλουραλίνη, 4-χλωροανιλίνη, 3,5-δινιτροανιλίνη, 4-μεθυλανιλίνη, N-μεθυλανιλίνη, 1-ναφθυλαμίνη);
- εστέρες αρωματικών καρβοξυλικών οξέων (π.χ. μεθυλεστέρας βενζοϊκού οξέος, αιθυλεστέρας 3,5-δινιτροβενζοϊκού οξέος);
- αρωματικοί υδρογονάνθρακες (π.χ. τολουόλιο, ξυλόλιο, αιθυλοβενζόλιο, νιτροβενζόλιο);
- εστέρες αρυλοξυφαινοξυπροπιοτικών οξέων (π.χ. diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl);
- μυκητοκτόνα βενζιμιδαζολίου και ιμιδαζολίου (π.χ. carbendazim, fuberidazole, triazoxide);
- αμίδια καρβοξυλικών οξέων (π.χ. 2-χλωροβενζαμίδιο, N,N-διμεθυλοβενζαμίδιο, 3,5-δινιτροβενζαμίδιο, N-μεθυλοβενζαμίδιο, 2-νιτροβενζαμίδιο, 3-νιτροβενζαμίδιο);
- χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (π.χ. endosulfan, DDT, εξαχλωροβενζόλιο, quintozone, 1,2,3-τριχλωροβενζόλιο);
- οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (π.χ. azinphos-methyl, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos, sulprofos, triazophos);
- φαινόλες (π.χ. φαινόλη, 2-νιτροφαινόλη, 4-νιτροφαινόλη, πενταχλωροφαινόλη, 2,4,6-τριχλωροφαινόλη, 1-ναφθόλη);
- παράγωγα φαινυλουρίας (π.χ. isoproturon, monolinuron, pencycuron);
- χρωστικές πιγμέντων (π.χ. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (π.χ. ακεναφθένιο, ναφθαλίνιο);
- ζιζανιοκτόνα 1,3,5-τριαζίνης (π.χ. prometryn, propazine, simazine, terbutryn);
- παράγωγα τριαζολίου (π.χ. tebuconazole, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται σε ουσίες που αντιδρούν είτε με το εκλουστικό μέσο, είτε με τη στατική φάση. Δεν εφαρμόζεται επίσης σε ουσίες που αλληλεπιδρούν με ειδικό τρόπο με ανόργανα συστατικά (π.χ. σχηματισμός συμπλόκων με ορυκτές αργίλους). Η μέθοδος μπορεί να μην είναι κατάλληλη για επιφανειοδραστικές ουσίες, ανόργανες ενώσεις και μετρίως ή ισχυρά οργανικά οξέα και βάσεις. Μπορούν να προσδιοριστούν τιμές $\log K_{oc}$ στην περιοχή από 1,5 έως 5,0. Οι ιοντίσιμες ουσίες πρέπει να μετρώνται με τη χρησιμοποίηση ρυθμισμένης κινητής φάσης, πρέπει όμως να δίνεται προσοχή για την αποφυγή καθίζησης ρυθμιστικών συστατικών ή της υπό δοκιμή ουσίας.

ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

1.6.1 **Ορθότητα**

Κανονικά, ο συντελεστής προσρόφησης μιας υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να εκτιμηθεί με προσέγγιση ± 0.5 λογαριθμικής μονάδας της τιμής που προσδιορίζεται με τη μέθοδο ισορροπίας παρτίδας (βλ. πίνακα 1 στο παράρτημα). Υψηλότερη ορθότητα μπορεί να επιτευχθεί, εφόσον οι χρησιμοποιούμενες ουσίες αναφοράς έχουν συντακτική δομή σχετική με εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας.

1.6.2 **Επαναληψιμότητα**

Οι προσδιορισμοί θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον εις διπλούν. Οι τιμές $\log K_{oc}$ που προέρχονται από μεμονωμένες μετρήσεις θα πρέπει να κυμαίνονται στα πλαίσια 0.25 λογαριθμικής μονάδας.

1.6.3 **Αναπαραγωγιμότητα**

Η εμπειρία που έχουν αποκομιστεί μέχρι τώρα από την εφαρμογή της μεθόδου αποτελεί στοιχείο υποστηρικτικό της εγκυρότητάς της. Διερεύνηση της μεθόδου HPLC, χρησιμοποιώντας 48 ουσίες (κατά το πλείστον γεωργικά φάρμακα) για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμα αξιόπιστα δεδομένα για το K_{oc} σε εδάφη, έδωσε συντελεστή συσχετισμού $R = 0.95$ (10) (11).

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή με 11 συμμετέχοντα εργαστήρια για τη βελτίωση και επικύρωση της μεθόδου (12). Τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 2 του παραρτήματος.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.7.1 **Προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή προσρόφησης**

Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού P_{ow} ($= K_{ow}$) και, σε έναν ορισμένο βαθμό, η υδατοδιαλυτότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες του βαθμού προσρόφησης, ιδιαίτερα για μη ιοντίσμες ουσίες και, έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για προκαταρκτική εύρεση εύρους. Έχουν δημοσιευτεί ποικίλοι χρήσιμοι συσχετισμοί για διάφορες ομάδες χημικών ουσιών (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2 **Εξοπλισμός**

Απαιτείται υγρός χρωματογράφος, εφοδιασμένος με απαλμική αντλία και κατάλληλη διάταξη ανίχνευσης. Συνιστάται η χρήση βαλβίδας εγχύσεως με βρόχο εγχύσεως. Πρέπει να χρησιμοποιούνται διαθέσιμες στο εμπόριο κυανοπροπυλικές ρητίνες ενωμένες χημικώς σε βάση πυριτίας (π.χ. Hypersil και Zorbax CN). Μεταξύ του συστήματος εγχύσεως και της αναλυτικής στήλης μπορεί να τοποθετηθεί στήλη προφύλαξης. Οι στήλες από διάφορους προμηθευτές μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από πλευράς ικανότητας διαχωρισμού. Κατά κανόνα, θα πρέπει να επιτυγχάνονται οι ακόλουθοι παράγοντες ικανότητας k' : $\log k' > 0.0$ για $\log K_{oc} = 3.0$ και $\log k' > -0.4$ για $\log K_{oc} = 2.0$ όταν, ως κινητή φάση, χρησιμοποιείται μεθανόλη/νερό 55/45 %.

1.7.3 **Κινητές φάσεις**

Έχουν δοκιμαστεί διάφορες κινητές φάσεις και από αυτές συνιστώνται οι ακόλουθες δύο:

- μεθανόλη/νερό (55/45 % v/v)
- μεθανόλη/ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0.01M, pH 6.0 (55/45% v/v)

Για την παρασκευή του διαλύτη εκλούσεως χρησιμοποιούνται μεθανόλη καθαρότητας HPLC και απεσταγμένο νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών. Το μίγμα απεριώνεται πριν από τη χρήση. Θα πρέπει να γίνεται χρήση ισοκρατικής εκλούσεως. Εάν τα μίγματα μεθανόλης/νερού δεν είναι κατάλληλα, μπορούν να δοκιμαστούν και μίγματα άλλου οργανικού διαλύτη/νερού, π.χ. μίγματα αιθανόλης/νερού ή ακετονιτριλίου/νερού. Για τις ιοντίσιμες ενώσεις, συνιστάται η χρησιμοποίηση ρυθμιστικού διαλύματος για τη σταθεροποίηση του pH. Πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην αποφυγή καθίζησης αλάτων και φθοράς της στήλης, πράγμα το οποίο μπορεί να συμβεί με ορισμένα μίγματα οργανικής φάσης/ρυθμιστικού.

Πρόσθετα, όπως αντιδραστήρια ιοντικού ζεύγους, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν επειδή μπορεί να επηρεάσουν τις ροφητικές ιδιότητες της στατικής φάσης. Οι αλλαγές αυτές της στατικής φάσης μπορεί να είναι μη αναστρέψιμες. Για το λόγο αυτό, πειράματα στα οποία χρησιμοποιούνται πρόσθετα, είναι υποχρεωτικό να γίνονται σε ξεχωριστές στήλες.

1.7.4 **Διαλύσιμα σώματα**

Οι ουσίες δοκιμής και αναφοράς θα πρέπει να διαλύονται στην κινητή φάση.

1.5 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.8.1 **Συνθήκες δοκιμής**

Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των μετρήσεων θα πρέπει να καταγράφεται. Συνιστάται ζοηρά η χρησιμοποίηση διαμερίσματος στήλης ελεγχόμενης θερμοκρασίας για τη διασφάλιση σταθερών συνθηκών κατά τη διάρκεια των εργασιών διακρίβωσης και εκτίμησης και μέτρησης της υπό δοκιμή ουσίας.

1.8.2 **Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_0**

Για τον προσδιορισμό του νεκρού χρόνου t_0 , μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικές μέθοδοι (βλ. επίσης σημείο 1.2).

1.8.2.1 *Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_0 μέσω ομόλογης σειράς*

Η διαδικασία αυτή έχει αποδειχθεί ότι παρέχει αξιόπιστες και τυποποιημένες τιμές t_0 . Για λεπτομέρειες, βλ. μέθοδο δοκιμής A.8: Συντελεστής κατανομής (n-οκτανόλη/νερό), μέθοδος HPLC.

1.8.2.2 *Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_0 με αδρανείς ουσίες που δεν κατακρατούνται από τη στήλη*

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην έγχυση διαλυμάτων φορμαμιδίου, ουρίας ή νιτρικού νατρίου. Οι μετρήσεις θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον εις διπλούν.

1.8.3 Προσδιορισμός των χρόνων κατακράτησης t_R

Οι ουσίες αναφοράς θα πρέπει να επιλέγονται όπως περιγράφεται στο σημείο 1.3. Μπορούν να εγχύονται ως μικτό πρότυπο για τον προσδιορισμό των χρόνων κατακράτησής τους, υπό την προϋπόθεση ότι έχει επιβεβαιωθεί ότι ο χρόνος κατακράτησης κάθε κάθε προτύπου αναφοράς δεν επηρεάζεται από την παρουσία των άλλων προτύπων αναφοράς. Η διακρίβωση θα πρέπει να εκτελείται σε τακτικά χρονικά διαστήματα δύο φορές, τουλάχιστον, ημερησίως, ώστε να λαμβάνονται υπόψη τυχόν απροσδόκητες μεταβολές στην απόδοση της στήλης. Το καλύτερο είναι, οι εγχύσεις διακρίβωσης να πραγματοποιούνται πριν και μετά τις εγχύσεις της υπό δοκιμή ουσίας ώστε να επιβεβαιώνεται ότι δεν έχουν υπάρξει μεταβολές στους χρόνους κατακράτησης. Οι υπό δοκιμή ουσίες εγχύονται ξεχωριστά σε όσο το δυνατό μικρότερες ποσότητες (για να αποφεύγεται υπερφόρτωση της στήλης) και προσδιορίζονται οι χρόνοι κατακράτησής τους.

Για την αύξηση της αξιοπιστίας της μετρήσεως, θα πρέπει να γίνονται δύο, τουλάχιστον, προσδιορισμοί. Οι τιμές του $\log K_{oc}$ που προέρχονται από μεμονωμένες μετρήσεις θα πρέπει να είναι στα όρια 0,25 λογαριθμικής μονάδας.

1.8.4 Εκτίμηση

Οι παράγοντες ικανότητας k' υπολογίζονται από το νεκρό χρόνο t_0 και τους χρόνους κατακράτησης t_R των επιλεγμένων ουσιών αναφοράς σύμφωνα με την εξίσωση 4 (βλ. σημείο 1.2). Στη συνέχεια, τα δεδομένα του $\log k'$ των ουσιών αναφοράς σημειώνονται επί χάρτου συναρτήσεως των τιμών του $\log K_{oc}$ από δοκιμές ισορροπίας παρτίδας που εμφανίζονται στους πίνακες 1 και 3 του παραρτήματος. Χρησιμοποιώντας τη γραφική αυτή συνάρτηση, η τιμή $\log k'$ μιας υπό δοκιμή ουσίας χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της τιμής της $\log K_{oc}$. Εάν τα λαμβανόμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο $\log K_{oc}$ της υπό δοκιμή ουσίας είναι εκτός της περιοχής διακρίβωσης, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας διαφορετικές, πιο κατάλληλες ουσίες αναφοράς.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ

Στην έκθεση πρέπει να αναφέρονται τα ακόλουθα στοιχεία:

- ταυτότητα των ουσιών δοκιμής και αναφοράς και καθαρότητά τους, καθώς και οι τιμές pK_a , αν χρειάζεται,
- περιγραφή εξοπλισμού και συνθηκών εργασίας, π.χ. τύπος και διαστάσεις της αναλυτικής (και προφυλακτικής) στήλης, μέσα ανίχνευσης, κινητή φάση (λόγος συστατικών και pH), περιοχή θερμοκρασιών κατά τις μετρήσεις,
- νεκρός χρόνος και μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της,
- ποσότητες ουσιών δοκιμής και αναφοράς που εισάγονται στη στήλη,
- χρόνοι κατακράτησης των ουσιών αναφοράς που χρησιμοποιούνται για διακρίβωση,
- λεπτομέρειες για τη διαμορφωμένη καμπύλη αναγωγής ($\log k'$ συναρτήσεως $\log K_{oc}$) και γράφημα της καμπύλης αναγωγής,
- στοιχεία μέσου χρόνου κατακράτησης και εκτιμώμενη τιμή $\log K_{oc}$ για την υπό δοκιμή ουσία,
- χρωματογραφήματα.

3.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.
- (3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
- (4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297-312.
- (6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831-832.
- (7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833-846.
- (8) W. Kørdel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere , 35(1/2), 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kørdel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493-2504.
- (10) W. Kørdel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kørdel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285-304.
- (12) W. Kørdel, G. Kotthoff, J. Möller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1

Σύγκριση τιμών K_{oc} για εδάφη και λάσπες υπονόμων και εκτιμώμενες τιμές με τη μέθοδο προσανατολισμού HPLC ^{1,2}

Ουσία	CAS-No.	log K_{oc} λασπών υπονόμων	log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} εδαφών	log K_{oc} HPLC	Δ
Ατραζίνη	1912-24-9	1.66	2.14	0.48	1.81	2.20	0.39
Linuron	330-55-2	2.43	2.96	0.53	2.59	2.89	0.30
Fenthion	55-38-9	3.75	3.58	0.17	3.31	3.40	0.09
Monuron	150-68-5	1.46	2.21	0.75	1.99	2.26	0.27
Φαινανθρένιο	85-01-8	4.35	3.72	0.63	4.09	3.52	0.57
Φαινυλεστέρας βενζοϊκού οξέος	93-99-2	3.26	3.03	0.23	2.87	2.94	0.07
Βενζαμίδιο	55-21-0	1.60	1.00	0.60	1.26	1.25	0.01
4-Νιτροβενζαμίδιο	619-80-7	1.52	1.49	0.03	1.93	1.66	0.27
Ακετανιλίδιο	103-84-4	1.52	1.53	0.01	1.26	1.69	0.08
Ανιλίνη	62-53-3	1.74	1.47	0.27	2.07	1.64	0.43
2,5-Διγλωροανιλίνη	95-82-9	2.45	2.59	0.14	2.55	2.58	0.03

¹ W. Kϋrdel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 - 128.

² W. Kϋrdel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 – 119.

Πίνακας 2

Αποτελέσματα διεργαστηριακής συγκριτικής δοκιμής (11 συμμετέχοντα εργαστήρια) που πραγματοποιήθηκε για τη βελτίωση και επικύρωση της μεθόδου HPLC¹

Ουσία	CAS-No.	log K_{oc} [OECD 106]	K_{oc}	log K_{oc}
			[Μέθοδος HPLC]	
Ατραζίνη	1912-24-9	1.81	78 ± 16	1.89
Monuron	150-68-5	1.99	100 ± 8	2.00
Triapenthenol	77608-88-3	2.37	292 ± 58	2.47
Linuron	330-55-2	2.59	465 ± 62	2.67
Fenthion	55-38-9	3.31	2062 ± 648	3.31

¹ W. Kϋrdel, G. Kotthoff, J. Mϋller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

Πίνακας 3

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς για τη μέθοδο προσανατολισμού HPLC που βασίζεται σε δεδομένα προσρόφησης εδάφους

Ουσία αναφοράς	CAS-No.	μέσες τιμές log K _{oc} από ισοροπία παρτίδας	αριθμός δεδομένων K _{oc}	log S.D.	πηγή
Ακετανιλίδιο	103-84-4	1.25	4	0.48	a
Φαινόλη	108-95-2	1.32	4	0.70	a
2-Νιτροβενζαμίδιο	610-15-1	1.45	3	0.90	b
N,N-διμεθυλοβενζαμίδιο	611-74-5	1.52	2	0.45	a
4-Μεθυλοβενζαμίδιο	619-55-6	1.78	3	1.76	a
Βενζοϊκός μεθυλεστέρας	93-58-3	1.80	4	1.08	a
Ατραζίνη	1912-24-9	1.81	3	1.08	c
Isoproturon	34123-59-6	1.86	5	1.53	c
3-Νιτροβενζαμίδιο	645-09-0	1.95	3	1.31	b
Ανιλίνη	62-53-3	2.07	4	1.73	a
3,5-Δινιτροβενζαμίδιο	121-81-3	2.31	3	1.27	b
Carbendazim	10605-21-7	2.35	3	1.37	c
Triadimenol	55219-65-3	2.40	3	1.85	c
Triazoxide	72459-58-6	2.44	3	1.66	c
Triazophos	24017-47-8	2.55	3	1.78	c
Linuron	330-55-2	2.59	3	1.97	c
Ναφθαλινό	91-20-3	2.75	4	2.20	a
Endosulfan-diol	2157-19-9	3.02	5	2.29	c
Methiocarb	2032-65-7	3.10	4	2.39	c
Acid Yellow 219	63405-85-6	3.16	4	2.83	a
1,2,3-Τριχλωροβενζόλιο	87-61-6	3.16	4	1.40	a
γ-HCH	58-89-9	3.23	5	2.94	a
Fenthion	55-38-9	3.31	3	2.49	c
Direct Red 81	2610-11-9	3.43	4	2.68	a
Pyrazophos	13457-18-6	3.65	3	2.70	c
α-Endosulfan	959-98-8	4.09	5	3.74	c
Diclofop-methyl	51338-27-3	4.20	3	3.77	c
Φαινανθρένιο	85-01-8	4.09	4	3.83	a
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4.89	4	4.46	a
DDT	50-29-3	5.63	1	–	b

- /a/ W. Kϋrdel, J. Mϋller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).
- /b/ B.V. Oepen, W. Kϋrdel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.
- /c/ Data provided by industry.

C.20 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ *DAPHNIA MAGNA*

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης τοξικότητας κατά την αναπαραγωγή αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 211 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρωταρχικός στόχος της δοκιμασίας είναι να μελετηθούν οι επιπτώσεις των χημικών ουσιών στην αναπαραγωγή των *Daphnia magna*.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Γεννήτορες: πρόκειται για τα θηλυκά *Daphnia* που είναι παρόντα κατά την έναρξη της δοκιμασίας και των οποίων οι αναπαραγωγικές επιδόσεις αποτελούν αντικείμενο της παρούσας μελέτης.

Απόγονοι: είναι τα νεαρά *Daphnia* που παράγονται από τους γεννήτορες στη διάρκεια της δοκιμασίας.

Ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίπτωσης (LOEC): είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ότι μια ουσία έχει επίπτωση στατιστικά σημαντική (με $p < 0,05$) σε συγκεκριμένη χρονική διάρκεια έκθεσης, στη θνησιμότητα των γεννητόρων και στην αναπαραγωγή, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Εντούτοις, όλες οι συγκεντρώσεις οι μεγαλύτερες από τη LOEC πρέπει να ασκούν βλαβερή επίδραση ισοδύναμη ή μεγαλύτερη από την παρατηρούμενη με τη LOEC. Όταν δεν ικανοποιούνται οι δύο αυτές προϋποθέσεις, πρέπει να εξηγηθεί αναλυτικά πώς επελέγη η τιμή της LOEC (και κατά συνέπεια της NOEC).

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίπτωσης (NOEC): είναι η συγκέντρωση η αμέσως χαμηλότερη της LOEC, η οποία, συγκριτικά με τους μάρτυρες, δεν έχει επίπτωση στατιστικά σημαντική (με $p < 0,05$) σε συγκεκριμένη χρονική διάρκεια έκθεσης.

EC_x: είναι η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας διαλυμένης σε νερό, που έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται κατά x% η αναπαραγωγή των *Daphnia magna* μέσα σε συγκεκριμένη χρονική διάρκεια έκθεσης.

Πραγματικός ρυθμός αύξησης: είναι ένα μέτρο της αύξησης του πληθυσμού στο οποίο συνυπάρχουν οι αναπαραγωγικές επιδόσεις και η θνησιμότητα ηλικίας (20) (21) (22). Σε σταθερούς πληθυσμούς είναι μηδενικός, σε αυξανόμενους είναι θετικός, αρνητικός δε σε πληθυσμούς που συρρικνώνονται. Στην τελευταία περίπτωση, οι πληθυσμοί προφανώς δεν είναι βιώσιμοι και τελικώς θα εξαφανιστούν.

Όριο ανίχνευσης: είναι η χαμηλότερη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση, όχι όμως και ποσοτικός μετρήσιμη.

Όριο προσδιορισμού: είναι η χαμηλότερη ποσοτικός μετρήσιμη συγκέντρωση.

Θνησιμότητα: ζώο καταγράφεται ως νεκρό εφόσον παραμένει ακίνητο, που σημαίνει όταν δεν μπορεί να κολυμπήσει ή όταν δεν παρατηρηθεί κίνηση των αποφύσεων ή της οπίσθιας κοιλιακής χώρας μέσα σε 15 δευτερόλεπτα μετά από ελαφρά ανατάραξη του δοχείου της δοκιμής. (Εάν χρησιμοποιηθεί άλλος ορισμός, αναφέρεται υποχρεωτικά, μαζί με κάθε σχετική παραπομπή).

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Νεαρά θηλυκά *Daphnia* (οι γεννήτορες), ηλικίας μικρότερης των 24 ωρών κατά την έναρξη της δοκιμασίας, εκτίθενται σε μια σειρά υδατικών διαλυμάτων της δοκιμαζόμενης ουσίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η διάρκεια της δοκιμασίας είναι 21 ημέρες. Με την ολοκλήρωση της δοκιμασίας, υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός ζώντων απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα. Αυτό σημαίνει ότι αποκλείονται από τους υπολογισμούς απόγονοι (juveniles) γεννητόρων που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας. Οι αναπαραγωγικές επιδόσεις των γεννητόρων υπάρχει τρόπος να εκφραστούν και αλλιώς (π.χ. αριθμός ζώντων απογόνων (offspring) ανά γεννήτορα σε ημερήσια βάση, αργής γενομένης από την πρώτη ημέρα κατά την οποία εμφανίζονται απόγονοι), τα δεδομένα όμως αυτά πρέπει να αναφέρονται επιπλέον του συνολικού αριθμού ζώντων απογόνων (juveniles) ανά ζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας. Οι αναπαραγωγικές επιδόσεις των ζώων που εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία συγκρίνονται προς το αντίστοιχο των μαρτύρων, για να προσδιοριστεί η τιμή LOEC και συνεπώς η NOEC. Επιπλέον, και στον βαθμό που είναι δυνατό, τα δεδομένα αναλύονται με βάση ένα αναγωγικό μοντέλο για να υπολογιστεί κατ'εκτίμηση η συγκέντρωση που προκαλεί x % μείωση του αναπαραγωγικού αποτελέσματος (π.χ. EC₅₀, EC₂₀, ή EC₁₀).

Αναφέρονται επίσης η επιβίωση των γεννητόρων και ο χρόνος μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρώτοι απόγονοι. Μπορεί να εξεταστούν και άλλες επιπτώσεις (που σχετίζονται με την ουσία) σε παραμέτρους όπως η ανάπτυξη (π.χ. μήκος), ενδεχομένως δε και ο πραγματικός ρυθμός αύξησης.

1.4 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Πρέπει να είναι γνωστά τα αποτελέσματα μιας δοκιμασίας μελέτης οξείας τοξικότητας (βλ. μέθοδο Γ.2 μέρος I) που πραγματοποιήθηκε σε *Daphnia magna*. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αποδειχτούν χρήσιμα για τη σωστή επιλογή μιας σειράς συγκεντρώσεων για τις δοκιμασίες αναπαραγωγής. Πρέπει επίσης να είναι γνωστές η διαλυτότητα στο νερό και η τάση ατιμών της δοκιμαζόμενης ουσίας, καθώς και μια αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ουσίας στα διαλύματα, της οποίας (μεθόδου) να αναφέρονται συντελεστής ανάκτησης και όριο προσδιορισμού.

Πληροφορίες για την ουσία οι οποίες ενδέχεται να αποδειχτούν χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών της δοκιμασίας είναι ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η σταθερότητα στο φως, η σταθερότητα στις συνθήκες της δοκιμασίας, οι συντελεστές pK_a, P_{ow} και τα αποτελέσματα μιας δοκιμασίας μελέτης της ευχέρειας βιοαποικοδόμησης (βλ. μέθοδο Γ.4).

1.5 ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Δοκιμασία θεωρείται έγκυρη εφόσον διαπιστωθεί κατόπιν ελέγχων ότι ικανοποιούνται τα παρακάτω δύο κριτήρια:

- η θνησιμότητα των γεννητόρων (θηλυκά *Daphnia*) δεν υπερβαίνει ποσοστό 20 % στο τέλος της δοκιμασίας
- ο μέσος όρος ζώντων απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας είναι ≥ 60 .

1.6 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1 Συσκευές και όργανα

Δοχεία και άλλα όργανα που θα έλθουν σε άμεση επαφή με τα διαλύματα πρέπει να είναι εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο υλικό χημικώς αδρανές. Τα δοχεία είναι κατά κανόνα γυάλινα κύπελλα.

Θα χρειαστεί επιπλέον ο παρακάτω εξοπλισμός ή μέρος αυτού:

- οξυγονόμετρο (με μικροηλεκτρόδιο ή άλλο εξοπλισμό μέτρησης διαλυμένου οξυγόνου σε δείγματα μικρού όγκου).
- κατάλληλη συσκευή παρακολούθησης της θερμοκρασίας.
- πεχάμετρο.
- εξοπλισμός προσδιορισμού της σκληρότητας του νερού.
- εξοπλισμός προσδιορισμού της συγκέντρωσης ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) στο νερό ή εξοπλισμός προσδιορισμού του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD).
- κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο του φωτισμού και τη μέτρηση της έντασης του φωτός.

1.6.2 Δοκιμαζόμενα είδη

Το είδος που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία ονομάζεται *Daphnia magna* Straus. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κι άλλα είδη *Daphnia*, υπό τον ότι ανταποκρίνονται στα κριτήρια εγκυρότητας κατά περίπτωση (το κριτήριο εγκυρότητας το σχετικό με τις αναπαραγωγικές επιδόσεις των μαρτύρων πρέπει να ανταποκρίνεται στα είδη *Daphnia*). Αν χρησιμοποιηθούν άλλα είδη *Daphnia*, πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς και να αιτιολογείται η επιλογή τους.

Η ταυτοποίηση του κλώνου προτιμότερο είναι να γίνεται με βάση τον γονότυπο. Η έρευνα (1) έδειξε ότι οι αναπαραγωγικές επιδόσεις του κλώνου A [ο οποίος προερχόταν από το IRCHA (Institut national de recherche chimique appliquée) της Γαλλίας] (3) ανταποκρίνονται στο κριτήριο εγκυρότητας που απαιτεί να είναι ≥ 60 ο μέσος όρος απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα, στις συνθήκες της περιγραφόμενης μεθόδου. Γίνονται όμως δεκτοί κι άλλοι κλώνοι, αρκεί να αποδειχτεί ότι η καλλιέργεια των *Daphnia* ανταποκρίνεται στα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμασίας.

Στο ξεκίνημα της δοκιμασίας, τα ζώα θα πρέπει να είναι ηλικίας μικρότερης των 24 ωρών και να μην είναι απόγονοι πρώτης γενιάς. Πρέπει επίσης να προέρχονται από υγιή παρτίδα (να μην εμφανίζουν δηλαδή σημάδια στρες όπως υψηλή θνησιμότητα, παρουσία αρσενικών και ερπητίων, καθυστέρηση στην παραγωγή της πρώτης γενιάς, αποχρωματισμένα ζώα, κ.λπ.). Τα προς δοκιμασία ζώα πρέπει να διατηρούνται σε συνθήκες καλλιέργειας (φωτισμός, θερμοκρασία, μέσο, διατροφή και αριθμός ζώων ανά μονάδα όγκου) όμοιες με τις συνθήκες υπό τις οποίες θα γίνει η δοκιμασία. Εάν το μέσο που θα χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια των *Daphnia* στο πλαίσιο της δοκιμασίας είναι άλλο από το χρησιμοποιούμενο σε τρέχουσες καλλιέργειες *Daphnia*, η ορθή πρακτική υπαγορεύει να προηγηθεί ένα χρονικό διάστημα εγκλιματισμού 3 κανονικά εβδομάδων (μιας γενεάς δηλαδή), ώστε να αποφευχθεί το στρες στους γεννήτορες.

1.6.3 Μέσο της δοκιμασίας

Συνιστάται η χρησιμοποίηση ενός μέσου επακριβώς καθορισμένου. Αποφεύγεται έτσι η χρήση προσθέτων (π.χ. φύκη, εκχυλίσματα χόματος, κ.λπ.), που δύσκολα περιγράφονται, με αποτέλεσμα να βελτιώνονται οι δυνατότητες τυποποίησης μεταξύ εργαστηρίων. Μέσα κατάλληλα προς τούτο θεωρούνται τα Elendt M4 (4) και M7 (βλ. παράρτημα 1). Αποδεκτά είναι όμως κι άλλα μέσα (π.χ. (5) (6)), αρκεί οι επιδόσεις της καλλιέργειας *Daphnia* αποδεδειγμένα να ανταποκρίνονται στα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμασίας.

Εάν στο μέσο της καλλιέργειας χρησιμοποιηθούν πρόσθετα, τα τελευταία θα πρέπει να προσδιορίζονται με σαφήνεια, και στην έκθεση της δοκιμασίας να δίδονται πληροφορίες για τη σύνθεσή τους, αναφορικά κυρίως με την περιεκτικότητα σε άνθρακα, αφού το δεδομένο αυτό μπορεί να ληφθεί υπόψη για τον καθορισμό της διατροφής. Συνιστάται να προσδιορίζεται ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) ή/και το χημικό απαιτούμενο οξυγόνο (COD) του κυρίως παρασκευάσματος με το οργανικό πρόσθετο, και να αξιολογείται η προκύπτουσα περιεκτικότητα του μέσου της δοκιμασίας σε TOC/COD. Οι τιμές TOC στο μέσο (πρωτού προστεθούν τα άλγη), συνιστάται να μην υπερβαίνουν 2 mg/l (7).

Όταν οι υπό δοκιμή ουσίες περιέχουν μέταλλα, είναι σημαντικό να διαπιστώνεται κατά πόσον οι ιδιότητες του μέσου (π.χ. σκληρότητα, ικανότητα σχηματισμού χηλικών ενώσεων) μπορεί να έχουν επίπτωση στην τοξικότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Το μέσο όπου θα γίνει η καλλιέργεια πρέπει λοιπόν να καθορίζεται επακριβώς. Τα μόνα όμως επακριβώς καθορισμένα μέσα που διατίθενται σήμερα για μακροπρόθεσμες καλλιέργειες *Daphnia magna* είναι τα Elendt M4 και M7. Περιέχουν και τα δύο τον χηλικό παράγοντα EDTA. Έχει αποδειχτεί (2) ότι η 'φαινόμενη τοξικότητα' του καδμίου είναι κατά κανόνα χαμηλότερη όταν για τη δοκιμασία αναπαραγωγής χρησιμοποιούνται τα μέσα M4 and M7, παρά όταν χρησιμοποιούνται μέσα που δεν περιέχουν EDTA. Έτσι τα μέσα M4 και M7 δεν συνιστώνται για δοκιμαζόμενες ουσίες που περιέχουν μέταλλα, καθώς επίσης πρέπει να αποφεύγονται και άλλα μέσα που περιέχουν γνωστούς χηλικούς παράγοντες. Για ουσίες που περιέχουν μέταλλα, είναι ίσως σκόπιμο να χρησιμοποιείται ένα εναλλακτικό μέσο π.χ. σκληρό γλυκό νερό που έχει ανασυσταθεί με βάση τις υποδείξεις ASTM (7), που δεν περιέχει EDTA, και στο οποίο έχει προστεθεί εκχύλισμα φυκών (8). Ο συνδυασμός τέτοιου σκληρού γλυκού νερού (ASTM) με εκχύλισμα φυκών προσφέρεται και για μακροπρόθεσμες καλλιέργειες και δοκιμασίες *Daphnia magna* (2), παρά το γεγονός ότι έχει κάποια ήπια χηλική δράση οφειλόμενη στα οργανικά συστατικά του προστεθειμένου εκχυλίσματος φυκών.

Κατά την έναρξη της δοκιμασίας αλλά και κατά τη διάρκεια αυτής, η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 3 mg/l. Το pH πρέπει να βρίσκεται στην περιοχή 6-9 και κανονικά να μην μεταβάλλεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδα στη διάρκεια μιας δοκιμασίας. Η σκληρότητα (εκφρασμένη ως CaCO₃) συνιστάται να είναι μεγαλύτερη από 140 mg/l. Δοκιμασίες που έγιναν με την τιμή αυτή ή και μεγαλύτερες έδειξαν αναπαραγωγικές επιδόσεις ανταποκρινόμενες στα κριτήρια εγκυρότητας (9) (10).

1.6.4 Διαλύματα δοκιμών

Η επιθυμητή συγκέντρωση των δοκιμαστικών διαλυμάτων επιτυγχάνεται συνήθως με αραιώση αρχικού πυκνού διαλύματος. Πυκνά διαλύματα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με διάλυση της ουσίας στο μέσο όπου θα γίνει η δοκιμασία.

Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να είναι απαραίτητη η χρήση οργανικών διαλυτών ή προσθέτων διασποράς ώστε το πυκνό διάλυμα που θα προκύψει να έχει την κατάλληλη συγκέντρωση, πρέπει όμως να καταβληθεί κάθε δυνατή προσπάθεια να μη χρησιμοποιηθούν τέτοια υλικά. Ανάμεσα στους κατάλληλους διαλύτες περιλαμβάνονται η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη, ενώ κατάλληλα πρόσθετα διασποράς είναι το Cremophor RH40, μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και HCO-40. Πάντως, η δοκιμαζόμενη ουσία η περιεχόμενη στα διαλύματα δεν πρέπει να υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας στο μέσο όπου γίνεται η δοκιμασία.

Οι διαλύτες χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πυκνού διαλύματος που να προστίθεται με ακρίβεια σε νερό. Στη συνιστώμενη συγκέντρωση του διαλύτη ($\leq 0,1$ ml/l) μέσα στο τελικό μέσο της δοκιμασίας, οι διαλύτες που αναφέρονται παραπάνω, δεν πρέπει να είναι ούτε τοξικοί ούτε να αυξάνουν την διαλυτότητα μιας ουσίας στο νερό.

Τα πρόσθετα διασποράς διευκολύνουν την επακριβή δοσομέτρηση και τη διασπορά. Στη συνιστώμενη συγκέντρωση ($\leq 0,1$ ml/l) μέσα στο τελικό μέσο της δοκιμασίας, τα πρόσθετα διασποράς που αναφέρονται παραπάνω, δεν πρέπει να είναι ούτε τοξικά ούτε να αυξάνουν την διαλυτότητα μιας ουσίας στο νερό.

1.7 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΕ ΓΕΝΙΚΕΣ ΓΡΑΜΜΕΣ

Τα παρασκευάσματα τοποθετούνται στα δοχεία και όλοι οι μετέπειτα χειρισμοί των δοχείων πρέπει να γίνονται κατά τρόπο τυχαίο. Σε αντίθετη περίπτωση, αν σημειωθεί κάποια στρέβλωση, θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως αποτέλεσμα συναρτώμενο με τη συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα, εάν ο χειρισμός των πειραματικών μονάδων γίνεται κατά σειρά συγκέντρωσης, τότε κάποιο φαινόμενο συνδεδεμένο με τον χρόνο (π.χ. κόπωση του χειριστή ή τυχόν σφάλμα) θα μπορούσε να πολλαπλασιάσει το αποτέλεσμα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, εάν υπάρχει πιθανότητα επηρεασμού των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας από μια αρχική ή περιβαλλοντική συνθήκη (π.χ. θέση στο εργαστήριο), τότε πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο τμηματικής πραγματοποίησης της δοκιμασίας.

1.8 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.8.1 Συνθήκες έκθεσης

1.8.1.1 Διάρκεια

Η διάρκεια της δοκιμασίας είναι 21 ημέρες.

1.8.1.2 Φορτίο

Σε κάθε δοχείο, που περιέχει 50 - 100 ml του μέσου της δοκιμασίας, τοποθετείται ανά ένας γεννήτορας.

Ενδέχεται να χρειαστούν και μεγαλύτεροι όγκοι ώστε να είναι δυνατή η εφαρμογή της ακολουθούμενης αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας, μολονότι δεν αποκλείεται και το ενδεχόμενο ανάμειξης διαλυμάτων της ίδιας συγκέντρωσης. Εάν χρησιμοποιηθούν όγκοι μεγαλύτεροι από 100 ml, ενδέχεται να χρειαστεί να αυξηθεί η μερίδα που χορηγείται στα *Daphnia*, ώστε και η διατροφή τους να είναι επαρκής αλλά και για τις ανάγκες εκπλήρωσης των κριτηρίων εγκυρότητας. Σε δοκιμασίες συνεχούς ροής, και για τεχνικούς λόγους, ο σχεδιασμός μπορεί να αλλάξει (να τοποθετηθούν δηλαδή 4 ομάδες των 10 ζώων σε μεγαλύτερο όγκο), κάθε όμως αλλαγή στον σχεδιασμό της δοκιμασίας πρέπει να αναφέρεται.

1.8.1.3 Αριθμός ζώων

Για ημιστατικές δοκιμασίες, απαιτούνται 10 τουλάχιστον ζώα που τοποθετούνται ανά ένα σε κάθε συγκέντρωση και 10 τουλάχιστον ζώα για τη σειρά των μαρτύρων.

Για δοκιμασίες συνεχούς ροής, αποδείχθηκε ότι κατάλληλος αριθμός είναι 40 ζώα σε 4 ομάδες των 10 για κάθε συγκέντρωση (1). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερος αριθμός ζώων και 20 τουλάχιστον ζώα ανά συγκέντρωση υποδιαμεμένα σε δύο ή περισσότερες ομάδες με τον ίδιο αριθμό ζώων η καθεμιά (π.χ. 4 ομάδες των 5 daphnia η καθεμιά). Να σημειωθεί ότι, σε δοκιμασίες όπου τα ζώα τοποθετούνται ομαδικά, δεν είναι δυνατό να εκφραστούν οι αναπαραγωγικές επιδόσεις ως συνολικός αριθμός ζώντων απογόνων ανά ζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας εάν σημειωθούν θάνατοι γεννητόρων. Στις περιπτώσεις αυτές, οι αναπαραγωγικές επιδόσεις πρέπει να εκφραστούν ως 'συνολικός αριθμός ζώντων απογόνων ανά γεννήτορα στην αρχή της δοκιμασίας'.

1.8.1.4 Τροφή

Σε ημιστατικές δοκιμασίες, η παροχή τροφής πρέπει κατά προτίμηση να γίνεται σε ημερήσια βάση, και πάντως τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα (σε συνάρτηση με τις αλλαγές του μέσου). Τυχόν διαφοροποιήσεις (π.χ. σε δοκιμασίες συνεχούς ροής) πρέπει να αναφέρονται.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, η τροφή που παρέχεται στους γεννήτορες είναι κατά προτίμηση ζωντανά μονοκύτταρα άλγη ενός ή περισσότερων από τα είδη: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (τώρα *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) και *Scenedesmus subspicatus*. Η διαίτα θα πρέπει να βασίζεται στην ποσότητα οργανικού άνθρακα (C) που παρέχεται σε κάθε γεννήτορα. Η έρευνα (12) έχει δείξει ότι για τα *Daphnia magna* μερίδες μεταξύ 0,1 και 0,2 mg C ανά ζώο ημερησίως αρκούν για να επιτευχθεί ο απαιτούμενος αριθμός απογόνων κατά την έννοια των κριτηρίων εγκυρότητας της δοκιμασίας. Η μερίδα μπορεί να παρέχεται είτε με σταθερό ρυθμό καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας ή, εάν κριθεί σκόπιμο, με βραδύτερο ρυθμό στην αρχή, που θα αυξάνεται στη συνέχεια όσο θα αναπτύσσονται οι γεννήτορες. Και σ' αυτήν όμως την περίπτωση, η μερίδα πρέπει πάντοτε να παραμένει στην περιοχή τιμών 0,1 έως 0,2 mg C ανά ζώο ημερησίως.

Εάν για πρακτικούς λόγους, όπως π.χ. ο αριθμός κυττάρων αλγών ή η απορρόφηση του φωτός, χρησιμοποιηθούν άλλες παράμετροι (π.χ.) για τον υπολογισμό της απαιτούμενης μερίδας (δεδομένου ότι η μέτρηση της περιεκτικότητας σε άνθρακα είναι χρονοβόρος), κάθε εργαστήριο οφείλει να εκπονήσει το δικό του νομογράφημα σχετικά με την εναλλακτική παράμετρο υπολογισμού της περιεκτικότητας της καλλιέργειας αλγών σε άνθρακα (βλ. παράρτημα 2 σχετικά με τη χάραξη νομογραφήματος). Τα νομογραφήματα πρέπει να ελέγχονται τουλάχιστον σε ετήσια βάση, συχνότερα δε εάν μεταβληθούν στο μεταξύ οι συνθήκες της καλλιέργειας. Η απορρόφηση του φωτός βρέθηκε ότι υπερτερεί του αριθμού των κυττάρων ως εναλλακτική παράμετρος για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας σε άνθρακα (13).

Στα *Daphnia* πρέπει να δίδεται ως τροφή συμπυκνωμένο αιώρημα αλγών, ώστε ο όγκος του μέσου με τη καλλιέργεια αλγών που μεταγγίζεται στα δοκιμαστικά δοχεία να είναι ο ελάχιστος δυνατός. Συμπύκνωση των αλγών μπορεί να επιτευχθεί με φυγοκέντρηση και εν συνεχεία επαναιώρηση σε απεσταγμένο νερό, απιονισμένο νερό ή μέσο με καλλιέργεια *Daphnia*.

1.8.1.5 Φως

Φωτισμός επί 16 ώρες με ένταση όχι μεγαλύτερη από $15\text{-}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία των μέσων στα οποία θα γίνει η δοκιμασία πρέπει να βρίσκεται στην περιοχή 18-22°C και, εφόσον είναι δυνατόν, να μην παρουσιάζει διακύμανση μεγαλύτερη από 2°C στο πλαίσιο μιας και μόνης δοκιμασίας (δηλ. 18-20, 19-21 ή 20-22°C). Για τις ανάγκες παρακολούθησης της θερμοκρασίας, ενδείκνυται ίσως η χρήση ενός επιπλέον δοκιμαστικού δοχείου.

1.8.1.7 Αερισμός

Τα δοχεία δεν πρέπει να αερίζονται κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

1.8.2 Συγκεντρώσεις

Κανονικά, η δοκιμασία πρέπει να γίνει σε πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεις που θα διαφέρουν μεταξύ τους κατά συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 3,2 και να γίνει για την κάθε συκέντρωση ο κατάλληλος αριθμός επαναλήψεων (βλ. 1.8.1.3). Εάν η δοκιμασία γίνει σε λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, θα πρέπει να δοθούν εξηγήσεις. Οι ουσίες δεν πρέπει να υπερβαίνουν το όριο διαλυτότητας στο μέσο της δοκιμασίας.

Για τον καθορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων, πρέπει να ληφθούν υπόψη τα εξής:

- i. Προκειμένου για τον υπολογισμό των τιμών LOEC και NOEC, η χαμηλότερη συκέντρωση πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή ώστε η γονιμότητα σ' αυτήν να μην είναι πολύ χαμηλότερη από την αντίστοιχη της ομάδας των μαρτύρων. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί με μειωμένη τιμή χαμηλότερης συκέντρωσης.
- ii. Προκειμένου για τον υπολογισμό των τιμών LOEC και NOEC, η υψηλότερη συκέντρωση πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή ώστε η γονιμότητα σ' αυτήν να είναι πολύ χαμηλότερη από την αντίστοιχη της ομάδας των μαρτύρων. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί με αυξημένη τιμή υψηλότερης συκέντρωσης.
- iii. Για τον υπολογισμό της τιμής EC_x σχετικά με την επίπτωση στις αναπαραγωγικές επιδόσεις, συνιστάται η χρησιμοποίηση επαρκών συγκεντρώσεων ώστε η EC_x να προσδιοριστεί με επαρκή αξιοπιστία. Για τον υπολογισμό της τιμής EC_{50} , συνιστάται όπως η υψηλότερη συκέντρωση είναι μεγαλύτερη από την εν λόγω EC_{50} . Διαφορετικά, μολονότι ο υπολογισμός της EC_{50} θα εξακολουθεί να είναι δυνατός, το διάστημα αξιοπιστίας θα είναι πολύ ευρύ, με ενδεχόμενο αποτέλεσμα να μην μπορεί να αξιολογηθεί ικανοποιητικά η επάρκεια του μοντέλου.
- iv. Καλό θα ήταν να μην περιλαμβάνονται μεταξύ των συγκεντρώσεων της δοκιμασίας τιμές που να έχουν επίπτωση στατιστικά σημαντική στην επιβίωση των ενήλικων ατόμων, αφού κάτι τέτοιο θα αλλοίωσε τον χαρακτήρα της δοκιμασίας και θα την μετέτρεπε από απλή δοκιμασία αναπαραγωγής σε συνδυασμένη δοκιμασία αναπαραγωγής και θνησιμότητας, που θα απαιτούσε πολύπλοκότερη στατιστική ανάλυση.

Εάν η τοξικότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας είναι εκ των προτέρων γνωστή (π.χ. από μελέτες οξείας τοξικότητας ή εντοπισμού εύρους τιμών), διευκολύνεται μάλλον η επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων.

Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης ή πρόσθετο διασποράς για την παρασκευή των διαλυμάτων (βλ. παράγραφο 1.6.4), η τελική τους συκέντρωση στα δοχεία δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/l, θα πρέπει μάλιστα να είναι η ίδια σε όλα τα δοχεία.

1.8.3 Μάρτυρες

Επιπλέον της κανονικής σειράς δοκιμασιών, πρέπει να γίνουν δοκιμασίες με μια σειρά μαρτύρων του δοκιμαστικού μέσου και, εφόσον έχει νόημα, με μια σειρά μαρτύρων που να περιέχουν τον διαλύτη ή το πρόσθετο διασποράς. Η συκέντρωση του διαλύτη ή του προσθέτου διασποράς πρέπει να είναι η ίδια με την αντίστοιχη στα δοχεία που περιέχουν τη δοκιμαζόμενη ουσία. Επιπλέον, απαιτείται κατάλληλος αριθμός επαναλήψεων (βλ. παράγραφο 1.8.1.3).

Κατά κανόνα, σε μια δοκιμασία που έγινε σωστά, ο συντελεστής διακύμανσης γύρω από τον μέσο αριθμό ζώντων απογόνων (offspring) ανά γεννήτορα στους μάρτυρες πρέπει να είναι $\leq 25\%$, πληροφορία που πρέπει να αναφέρεται όταν πρόκειται για δοκιμασίες κατά τις οποίες τα ζώα τοποθετούνται ανά ένα στα δοχεία.

1.8.4 Ανανέωση του μέσου

Η συχνότητα ανανέωσης του μέσου εξαρτάται από τη σταθερότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας, πρέπει πάντως να γίνεται τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα. Εάν από προκαταρκτικές δοκιμασίες μελέτης της σταθερότητας (βλ. 1.4) είναι γνωστό ότι η συκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν είναι σταθερή (βρίσκεται δηλαδή εκτός των ορίων 80 - 120 % της ονομαστικής συκέντρωσης ή κάτω από το 80 % της αρχικά μετρηθείσας συκέντρωσης) σε όλη τη διάρκεια της μέγιστης προθεσμίας ανανέωσης (δηλ. 3 ημέρες), πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο να ανανεώνεται συχνότερα το μέσο ή η δοκιμασία να είναι συνεχούς ροής.

Όταν γίνεται ανανέωση του μέσου σε ημιστατικές δοκιμασίες, ετοιμάζεται μια δεύτερη σειρά δοκιμαστικών δοχείων, όπου μεταφέρονται σ' αυτά οι γεννήτορες με γυάλινο σωλήνα κατάλληλης διαμέτρου (για παράδειγμα). Ο όγκος του μέσου που μεταφέρεται μαζί με τα *Daphnia* πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός.

1.8.5 Παρατηρήσεις

Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων καταγράφονται σε πίνακες (βλ. παραρτήματα 3 και 4). Αν χρειαστεί να γίνουν κι άλλες μετρήσεις (βλ. 1.3 και 1.8.8), θα υπάρξουν ενδεχομένως κι άλλες παρατηρήσεις.

1.8.6 Απόγονοι

Οι απόγονοι (offspring) οι παραγόμενοι από κάθε γεννήτορα είναι προτιμότερο να καταμετρούνται και να απομακρύνονται σε ημερήσια βάση, αμέσως μόλις εμφανιστεί η πρώτη γονή, ώστε να μην καταναλώσουν τροφή προοριζόμενη για τους γεννήτορες. Για τις ανάγκες αυτής της μεθόδου, καταμετρούνται μόνο οι ζώντες απόγονοι (offspring), καταγράφονται όμως τα αβγά των οποίων δεν ολοκληρώθηκε η ανάπτυξη καθώς και οι νεκροί απόγονοι (offspring).

1.8.7 Θνησιμότητα

Η θνησιμότητα των γεννητόρων καταγράφεται σε ημερήσια κατά προτίμηση βάση, και τουλάχιστον κάθε φορά που καταμετρούνται οι απόγονοι (offspring).

1.8.8 Άλλες παράμετροι

Μολονότι η υπόψη μέθοδος αποβλέπει κατά κύριο λόγο σε μελέτη των επί της αναπαραγωγής επιπτώσεων, ενδέχεται να παρατηρηθούν κι άλλες επιπτώσεις ποσοτικών μετρήσιμες ώστε να έχει νόημα η στατιστική τους ανάλυση. Οι μετρήσεις που αφορούν την ανάπτυξη παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, γιατί δίνουν πληροφορίες για ενδεχόμενες επιπτώσεις σχεδόν θανατηφόρες, και με την έννοια αυτή ενδέχεται να είναι πιο χρήσιμες από τις μετρήσεις μόνο των επιπτώσεων στην αναπαραγωγή. Συνιστάται η μέτρηση του μήκους των γεννητόρων (μήκος του σώματος χωρίς την εδρική άκανθα) στο τέλος της δοκιμασίας. Άλλες παράμετροι που μπορούν να μετρηθούν ή να υπολογιστούν είναι ο χρόνος μέχρις ότου παραχθεί η πρώτη γονή (και οι επόμενες), πόσες φορές γεννάει κάθε γεννήτορας και πόσους απογόνους κάθε φορά, ο αριθμός των αβγών των οποίων δεν ολοκληρώθηκε η ανάπτυξη, η παρουσία αρσενικών ή ερπιτίων και ο πραγματικός ρυθμός αύξησης του πληθυσμού.

1.8.9 Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων

Η συγκέντρωση του οξυγόνου, η θερμοκρασία, η σκληρότητα και το pH πρέπει να μετρούνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, πριν και μετά την ανανέωση του μέσου, στους μάρτυρες και στην υψηλότερη συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, οι συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας προσδιορίζονται σε τακτά διαστήματα.

Σε ημιστατικές δοκιμασίες όπου η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας αναμένεται να μεταβάλλεται κατά $\pm 20\%$ σε σχέση με την ονομαστική (να κυμαίνεται δηλαδή εντός των ορίων 80 - 120 % - βλ. 1.4 και 1.8.4), συνιστάται να προσδιορίζονται τουλάχιστον η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση αμέσως μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα και με την ευκαιρία μιας ανανέωσης μέσα στην πρώτη εβδομάδα της δοκιμασίας (οι μετρήσεις δηλαδή πρέπει να γίνονται σε δείγματα του ίδιου διαλύματος, μία φορά μόλις παρασκευαστούν και μια δεύτερη μόλις ανανεωθούν). Στη συνέχεια, οι μετρήσεις αυτές πρέπει να επαναλαμβάνονται σε εβδομαδιαία τουλάχιστον βάση.

Σε δοκιμασίες όπου η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας αναμένεται να κυμαίνεται εντός των ορίων $\pm 20\%$ σε σχέση με την ονομαστική τιμή, είναι ανάγκη να προσδιορίζονται όλες οι συγκεντρώσεις, αμέσως μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα και κατά την ανανέωση. Εντούτοις, σε δοκιμασίες όπου η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν κυμαίνεται εντός του $\pm 20\%$ σε σχέση με την ονομαστική τιμή και εφόσον μπορεί να αποδειχτεί ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι επαναληπτικές και σταθερές (κυμαίνονται δηλαδή μέσα στα όρια 80 - 120 % των αρχικών συγκεντρώσεων), οι μετρήσεις κατά τη διάρκεια της δεύτερης και της τρίτης εβδομάδας της δοκιμασίας μπορούν να περιοριστούν στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας πριν την ανανέωση χρειάζεται να γίνεται μόνο σε ένα δοχείο, από αυτά που χρησιμοποιούν για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

Σε δοκιμασία συνεχούς ροής, ενδείκνυται καθεστώς δειγματοληψίας ανάλογο με το περιγραφόμενο για ημιστατικές δοκιμασίες (στην περίπτωση όμως αυτή δεν ισχύουν οι μετρήσεις "παλαιών" διαλυμάτων). Εντούτοις, καλό θα ήταν να αυξηθεί ο αριθμός των δειγματοληψιών στη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας (π.χ. τρεις σειρές μετρήσεων) ώστε να είναι βέβαιο ότι οι συγκεντρώσεις παραμένουν σταθερές. Σε δοκιμασίες αυτού του τύπου, ο ρυθμός ροής του μέσου αραιώσης και της δοκιμαζόμενης ουσίας πρέπει να ελέγχονται καθημερινά.

Εάν μπορεί να αποδειχτεί ότι η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας κυμάνθηκε στη διάρκεια της δοκιμασίας κατά $\pm 20\%$ σε σχέση με την ονομαστική ή την αρχική μετρηθείσα, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να βασιστούν στις ονομαστικές ή τις αρχικές μετρηθείσες τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή την αρχική μετρηθείσα συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη από $\pm 20\%$, τα αποτελέσματα πρέπει να εκφραστούν ως μέσος όρος συναρτήσει του χρόνου (βλ. παράρτημα 5).

2. ΑΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

2.1 ΕΠΙΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η εν λόγω δοκιμασία αποσκοπεί σε προσδιορισμό των επιπτώσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας επί του συνολικού αριθμού ζώντων απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας. Ο συνολικός αριθμός ζώντων απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα πρέπει να υπολογίζεται για κάθε δοχείο (με την ίδια συγκέντρωση). Εάν κατά τη διάρκεια δοκιμασίας ο γεννήτορας πεθάνει ή αποδειχτεί αρσενικό άτομο, το συγκεκριμένο δοχείο εξαιρείται από την ανάλυση, η οποία και θα βασιστεί σε μειωμένο αριθμό δοχείων της ίδιας συγκέντρωσης.

Για τον προσδιορισμό της LOEC - και συνεπώς της NOEC (για τις επιπτώσεις της χημικής ουσίας στις αναπαραγωγικές επιδόσεις), πρέπει να υπολογιστεί ο μέσος όρος των αναπαραγωγικών επιδόσεων επί όλων των δοχείων της ίδιας συγκέντρωσης και η συνολική παραμένουσα τυπική απόκλιση, πράγμα που μπορεί να γίνει με ανάλυση διασποράς (ANOVA). Ο μέσος όρος που αντιστοιχεί σε κάθε συγκέντρωση συγκρίνεται στη συνέχεια με τον μέσο όρο που αντιστοιχεί στους μάρτυρες, με τη βοήθεια κατάλληλης μεθόδου πολλαπλών συγκρίσεων. Ενδείκνυται ενδεχομένως οι δοκιμασίες Dunnett ή Williams (14)(15)(16)(17). Είναι ανάγκη να εξακριβώνεται κατά πόσον ευσταθεί η υπόθεση (της ανάλυσης ANOVA) περί ομοιογένειας της διασποράς. Συνιστάται μάλιστα αυτό να γίνεται με γραφική παράσταση μάλλον παρά με έναν τυπικό έλεγχο σημαντικότητας (18). πρόσφορη εναλλακτική λύση είναι μια δοκιμασία Bartlett. Εάν διαπιστωθεί ότι η υπόθεση αυτή δεν ευσταθεί, τότε πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο μετατροπής των δεδομένων ώστε να ομογενοποιηθούν οι διασπορές προτού γίνει ανάλυση διασποράς (ANOVA), ή να γίνει μια σταθμισμένη ανάλυση διασποράς (ANOVA). Υπολογίζεται και καταγράφεται ο βαθμός επίπτωσης που μπορεί να εντοπιστεί μέσω ANOVA (ήτοι η ελάχιστη σημαντική διαφορά).

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση που έχει ως αποτέλεσμα μείωση των αναπαραγωγικών επιδόσεων κατά 50% (δηλ. η EC₅₀), μια κατάλληλη καμπύλη, όπως η λογιστική καμπύλη, πρέπει να προσαρμοστεί στα δεδομένα με τη βοήθεια στατιστικής μεθόδου, όπως είναι η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων. Η καμπύλη μπορεί να γίνει παραμετρική ώστε να μπορούν να προσδιοριστούν απευθείας η EC₅₀ και το τυπικό σφάλμα αυτής. Διευκολύνεται έτσι σε μεγάλο βαθμό ο υπολογισμός του ορίου εμπιστοσύνης της EC₅₀. Καθορίζεται αμφίπλευρο όριο εμπιστοσύνης 95%, εκτός εάν υπάρχουν βάσιμοι λόγοι να καθορισθεί άλλο. Η διαδικασία προσαρμογής καλό είναι να επιτρέψει να αξιολογείται ο βαθμός έλλειψης προσαρμογής. Αυτό μπορεί να γίνει με γραφική παράσταση ή με διαχωρισμό του αθροίσματος των τετραγώνων σε "έλλειψη προσαρμογής" και σε "συνιστώσες καθαρού σφάλματος" και με πραγματοποίηση ελέγχου σημαντικότητας της έλλειψης προσαρμογής. Αφού τα διαλύματα που συμβάλλουν σε υψηλή γονιμότητα αναμένεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη διασπορά του αριθμού παραγόμενων απογόνων (juveniles) από εκείνα που συμβάλλουν σε χαμηλή γονιμότητα, πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο στάθμισης των παρατηρούμενων τιμών κατά τρόπο ώστε να απηχούν τις διαφορές που εμφανίζουν οι διάφορες ομάδες ως προς τη διασπορά (βλ. παραπομπή αριθ. 18 στη βιβλιογραφία).

Κατά την ανάλυση των δεδομένων της τελικής δοκιμασίας δακτυλίου (2), χαράχθηκε μια λογιστική καμπύλη με τη βοήθεια του παρακάτω μοντέλου, μολονότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν κι άλλα μοντέλα:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

όπου:

Y: ο συνολικός αριθμός απογόνων (juveniles) ανά ζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας (υπολογιζόμενος για κάθε δοχείο χωριστά)

x: η συγκέντρωση της ουσίας

c : ο αναμενόμενος αριθμός απογόνων (juveniles) όταν x=0

x₀: η EC₅₀ στον πληθυσμό

b : η κλίση της καμπύλης

Το μοντέλο αυτό μπορεί να καλύψει μεγάλο αριθμό καταστάσεων, υπάρχουν όμως και δοκιμασίες για τις οποίες δεν ενδείκνυται. Η καταλληλότητα του ως άνω μοντέλου πρέπει να ελέγχεται. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να ενδείκνυται ένα μοντέλο (hormesis model) στο οποίο χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν αυξημένη επίπτωση (19).

Μπορούν επίσης να προσδιοριστούν κι άλλες συγκεντρώσεις που έχουν επίπτωση στην αναπαραγωγή, όπως οι EC₁₀ και EC₂₀, αν και είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί παράμετροι από εκείνες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της EC₅₀.

2.2 ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1 Δοκιμαζόμενη ουσία

- φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες που άπτονται της δοκιμασίας·
- χημικά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων η καθαρότητα.

2.2.2 Δοκιμαζόμενο είδος

- ο κλώνος (διευκρινίζεται κατά πόσον έχει προσδιοριστεί ο γονότυπός του), προμηθευτής ή πηγή (εάν είναι γνωστά) και συνθήκες καλλιέργειας. Εάν χρησιμοποιηθεί είδος άλλο από τα *Daphnia magna*, αναφέρεται και αιτιολογείται.

2.2.3 Συνθήκες της δοκιμασίας

- ακολουθούμενη διαδικασία (ημιστατική ή συνεχούς ροής, όγκος, φορτίο=αριθμός *Daphnia* ανά λίτρο)·
- φωτοπερίοδος και ένταση του φωτός·
- συνοπτική περιγραφή της δοκιμασίας (π.χ. αριθμός δοχείων με την ίδια συγκέντρωση, αριθμός γεννητόρων ανά δοχείο)·
- λεπτομερείς πληροφορίες για το μέσο όπου γίνεται η καλλιέργεια·
- τυχόν προστιθέμενες οργανικές ύλες (σύνθεση, πηγή προέλευσης, μέθοδος παρασκευής), TOC/COD των πυκνών διαλυμάτων, προσδιορισμός TOC/COD στο μέσο όπου γίνεται η δοκιμασία·
- λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την παροχή τροφής [ποσότητα σε mg C/*Daphnia* ημερησίως, είδος τροφής (εάν πρόκειται για φύκη, ονομασίες των ειδών, και, εάν είναι γνωστά, το στέλεχος και οι συνθήκες της καλλιέργειας)]·
- μέθοδος παρασκευής των πυκνών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (αναφέρονται, εφόσον χρησιμοποιούνται, διαλύτης και πρόσθετο διασποράς και σε τι συγκέντρωση)·

2.2.4

Αποτελέσματα

- αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικών μελετών σχετικά με τη σταθερότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας
- ονομαστικές συγκεντρώσεις και αποτελέσματα όλων των αναλύσεων προσδιορισμού της συγκέντρωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας στα δοκιμαστικά δοχεία (βλ. πίνακες παραρτήματος 4)· αναφέρονται επίσης συντελεστής ανάκτησης της μεθόδου και όριο προσδιορισμού·
- ποιότητα του νερού στα δοκιμαστικά δοχεία (pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, TOC ή/και COD και σκληρότητα κατά περίπτωση) (βλ. πίνακα παραρτήματος 3)·
- πλήρης καταγραφή ζώντων απογόνων (offspring) ανά γεννήτορα (βλ. πίνακα παραρτήματος 3)·
- αριθμός θανάτων μεταξύ των γεννητόρων και ημέρα κατά την οποία σημειώθηκαν (βλ. πίνακα παραρτήματος 3)·
- συντελεστής διακύμανσης για τον έλεγχο γονιμότητας (βάσει του συνολικού αριθμού ζώντων απογόνων (offspring) ανά γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας)·
- γραφική παράσταση του συνολικού αριθμού ζώντων απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα (για κάθε συγκέντρωση διαλύματος) στο τέλος της δοκιμασίας συναρτήσει της συγκέντρωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας·
- η ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίπτωσης (LOEC) στην αναπαραγωγή (συμπεριλαμβάνονται περιγραφή των στατιστικών μεθόδων που εφαρμόζονται και ενδεικτική αναφορά ως προς τον πιθανό βαθμό επίπτωσης) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίπτωσης (NOEC) στην αναπαραγωγή· αναφέρονται κατά περίπτωση οι τιμές LOEC και NOEC για τη θνησιμότητα των γεννητόρων·
- κατά περίπτωση, η τιμή της συγκέντρωσης EC_x για την αναπαραγωγή και το όριο εμπιστοσύνης και γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της, η κλίση της καμπύλης δόσης-απόκρισης και το τυπικό σφάλμα·
- άλλες βιολογικές επιπτώσεις και μετρήσεις· αναφέρονται τυχόν άλλες βιολογικές επιπτώσεις που παρατηρήθηκαν ή μετρήθηκαν (π.χ. ανάπτυξη των γεννητόρων), συνοδευόμενες από τυχόν εξήγηση·
- αιτιολόγηση κάθε παρέκκλισης από τη μέθοδο της δοκιμασίας·

3.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.
- 2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.
- 3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 257-265.
- 4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, **154**, 25-33.
- 5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- 6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 775-782.
- 7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.L.ψkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- 9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, 1-8.
- 10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), 185-196.
- 11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.
- 12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2053-2058.
- 13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.
- 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, N.Y.
- 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.
- 20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- 22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΜΕΣΩΝ ELENDT M7 ΚΑΙ M4
ΕΠΑΚΡΙΒΩΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ**

Εγκλιματισμός των *Daphnia* στα ElenDt M7 and M4

Μερικά εργαστήρια αντιμετώπισαν δυσκολίες κατά την άμεση μεταφορά *Daphnia* στα μέσα M4 (1) και M7, οι οποίες όμως ξεπεράστηκαν σε κάποιο βαθμό με σταδιακό εγκλιματισμό, με μεταφορά δηλαδή από το μέσον στο οποίο βρίσκόντουσαν σε συγκέντρωση 30 % ,στη συνέχεια σε συγκέντρωση 60 % και κατόπιν σε 100 %. Ο εγκλιματισμός μπορεί να διαρκέσει έως και ένα μήνα.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

Υγροστοιχεία

Παρασκευάζονται πρώτα σε νερό κατάλληλης καθαρότητας (π.χ. απιονισμένο, απεσταγμένο ή αντίστροφης όσμωσης) ξεχωριστά πυκνά διαλύματα (I) μεμονωμένων υγροστοιχείων. Από τα διαφορετικά αυτά πυκνά διαλύματα (I) παρασκευάζεται ένα δεύτερο ενιαίο πυκνό διάλυμα (II), το οποίο περιέχει όλα τα υγροστοιχεία (συνδυασμένη λύση), ήτοι:

Πυκνά διαλύματα I (μία ουσία)	Ποσότητα που προστίθεται στο νερό mg/l	Συγκέντρωση (συγκριτικά με το μέσο M4)	Για την παρασκευή του συνδυασμένου πυκνού διαλύματος II, προστίθεται σε νερό η εξής ποσότητα πυκνού διαλύματος I ml/l	
			M 4.....	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 φορές	1,0	0,25
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	7 210	20 000 φορές	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 φορές	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 φορές	1,0	0,25
SrCl ₂ * 6 H ₂ O	3 040	20 000 φορές	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 φορές	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	1 260	20 000 φορές	1,0	0,25
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	335	20 000 φορές	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000 φορές	1,0	1,0
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	200	20 000 φορές	1,0	1,0
KI	65	20 000 φορές	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43.8	20 000 φορές	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11.5	20 000 φορές	1,0	1,0
Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O	5 000	2 000 φορές	–	–
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1 991	2 000 φορές	–	–
Τα διαλύματα Na ₂ EDTA και FeSO ₄ παρασκευάζονται χωριστά το καθένα, στη συνέχεια αναμιγνύονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκλειστο και το αποτέλεσμα είναι:				
διάλυμα 21 Fe-EDTA		1 000 φορές	20,0	5,0

Μέσα M4 and M7

Παρασκευάζονται με πυκνό διάλυμα ΙΙ, μακροθρεπτικές ύλες και βιταμίνες ως εξής:

	Ποσότητα που προστίθεται στο νερό mg/l	Συγκέντρωση (συγκριτικά με το μέσο M4)	Ποσότητα πυκνού διαλύματος που προστίθεται για την παρασκευή του μέσου	
			ml/l	
			M 4	M 7
Πυκνό διάλυμα ΙΙ συνδυασμός ιχνοστοιχείων		20 φορές	50	50
Πυκνά διαλύματα με μακροθρεπτικές ύλες (μία ουσία)				
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	293 800	1 000 φορές	1,0	1,0
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246 600	2 000 φορές	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 φορές	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000 φορές	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ * 9 H ₂ O	50 000	5 000 φορές	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000 φορές	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000 φορές	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000 φορές	0,1	0,1
Πυκνό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών	–	10 000 φορές	0,1	0,1
Το πυκνό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών παρασκευάζεται με προσθήκη των τριών βιταμινών σε 1 λίτρο νερού ως εξής:				
Υδροχλωρική θειαμίνη	750	10 000 φορές	–	–
Κυανοκοβαλαμίνη (B ₁₂)	10	10 000 φορές	–	–
Βιοτίνη	7,5	10 000 φορές	–	–

Το πυκνό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών αποθηκεύεται κατεψυγμένο, σε μικρά μερίδια. Οι βιταμίνες προστίθενται στα μέσα λίγο πριν τη χρήση.

Σημ. 1 Προς αποφυγή καθίζησης αλάτων κατά τη διαδικασία παρασκευής του πλήρους μέσου, προστίθενται οι ποσότητες των πυκνών διαλυμάτων σε 500-800 ml απιοντισμένου νερού και εν συνεχεία ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι ενός λίτρου.

Σημ. 2 Η πρώτη δημοσίευση σχετικά με το M4 βρίσκεται στο Elenkt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, **154**, 25-33.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ (TOC) ΚΑΙ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΟΜΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΛΑΓΩΝ ΤΡΟΦΗΣ ΣΕ TOC

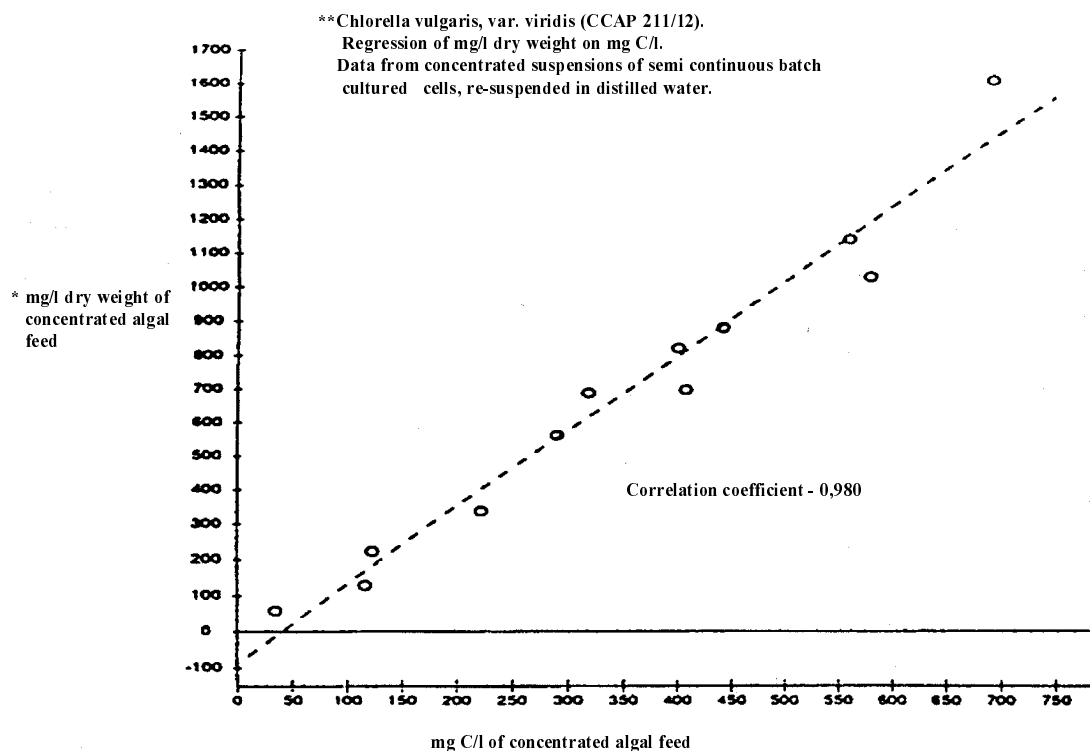
Η περιεκτικότητα σε άνθρακα των αλγών που χρησιμοποιούνται ως τροφή δεν μπορεί κανονικά να μετρηθεί απευθείας αλλά έμμεσα με τη βοήθεια νομογραφήματων, όπου χρησιμοποιούνται ως παράμετροι ο αριθμός των κυττάρων ή η απορρόφηση του φωτός.

Ο προσδιορισμός του TOC πρέπει να γίνεται με τη μέθοδο της οξείδωσης σε υψηλή θερμοκρασία μάλλον παρά με άλλες μεθόδους όπως με τη μέθοδο της υπερϊώδους ακτινοβολίας ή τη μέθοδο του υπερθειικού (βλ.: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinants 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Για τη χάραξη του νομογραφήματος, τα άλγη διαχωρίζονται από το μέσο της καλλιέργειας με φυγοκέντρηση και εν συνεχεία επαναϊώρηση σε απεσταγμένο νερό. Μετρείται η εναλλακτική παράμετρος και η συγκέντρωση TOC σε κάθε δείγμα τρεις φορές. Αναλύονται τα τυφλά διαλύματα που περιέχουν απεσταγμένο νερό και η συγκέντρωση TOC συνάγεται από την αντίστοιχη του δείγματος με τα άλγη.

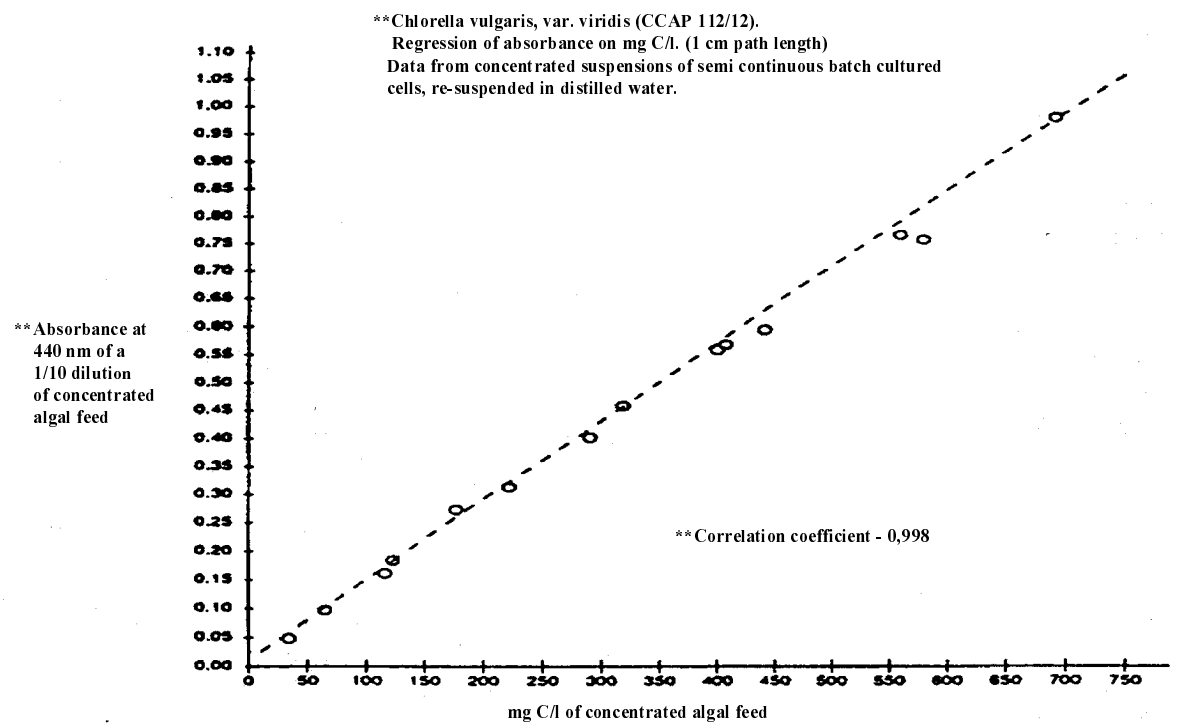
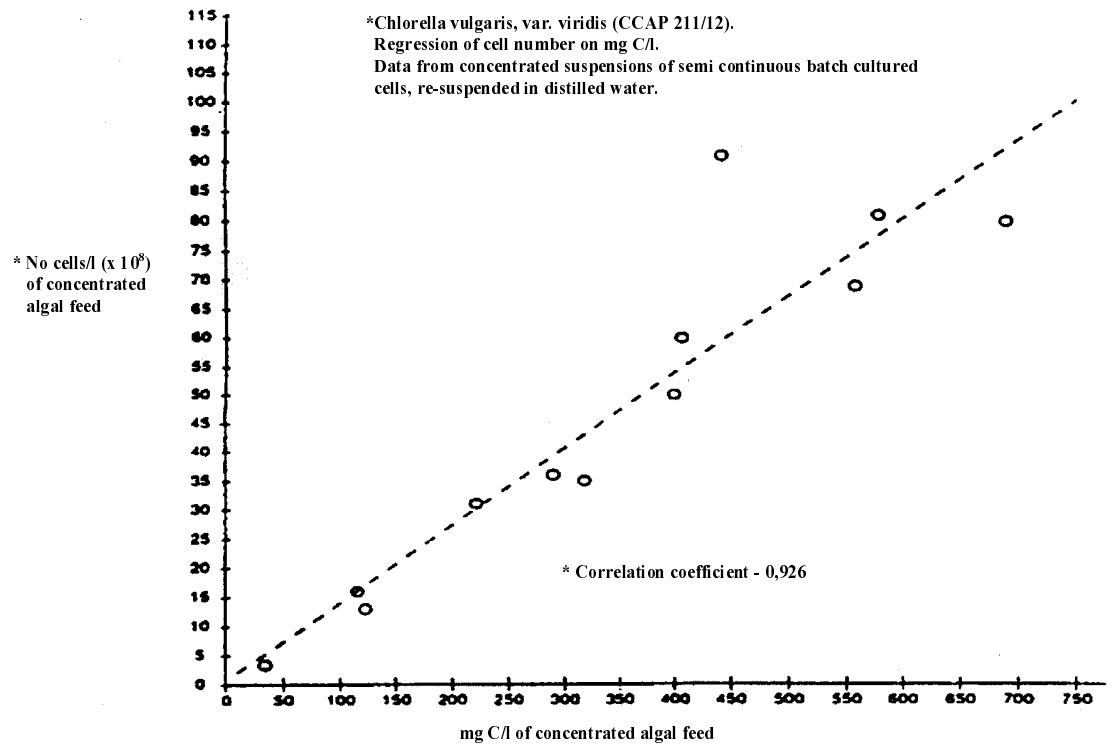
Η γραμμή του νομογραφήματος πρέπει να είναι ευθεία στην περιοχή των συγκεντρώσεων άνθρακα που ενδιαφέρουν. Σχετικά παραδείγματα δίνονται στη συνέχεια.

Σημ. Τα νομογραφήματα που ακολουθούν δεν προσφέρονται για μετατροπές. Τα εργαστήρια χαράσσουν τα δικά τους νομογραφήματα.



* ξηρό βάρος συμπυκνωμένης τροφής από φύκη (σε mg/l)
συμπυκνωμένη τροφή από φύκη (σε mg/l)
συντελεστής συσχέτισης - 0,980

** Chlorella vulgaris, ποικιλία viridis (CCAP 211/12)
Αναγωγή ξηρού βάρους (mg/l) σε mg C/l.
Δεδομένα από συμπυκνωμένα εναιωρήματα κυτταροκαλλιιεργειών ημισυνεχούς ροής,
που επαναϊώθηκαν σε απεσταγμένο νερό



* Αριθμός κυττάρων/l ($\times 10^8$) συμπυκνωμένης τροφής από άλγη
Παλινδρόμηση αριθμού κυττάρων σε mg C/l
Συντελεστής συσχέτισης 0,926

** Απορρόφηση στα 440 nm συμπυκνωμένης τροφής από άλγη σε αραιώση 1/10
Παλινδρόμηση απορρόφησης σε mg C/l (μήκος διαδρομής 1 cm)
Συντελεστής συσχέτισης 0,998

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΦΥΛΟΥ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΟΠΟΥ ΚΑΤΑΓΡΑΦΟΝΤΑΙ Η ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ, Η ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΗ ΤΡΟΦΗ, Η ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΑΡΗΝΙΑ ΚΑΙ Η ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Αρ. Πειράματος: Ημερομηνία έναρξης: Κλώνος: Μέσο: Είδος τροφής: Δοκιμαζόμενη ουσία: Ονομαστικές συγκεντρώσεις:

Ημέρα	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
ανανέωση του μέσου (v)																									
PH *																									νέα τιμή
																									παλιά τιμή
O ₂ mg/l *																									νέα τιμή
																									παλιά τιμή
θερμοκρασία																									νέα τιμή
																									παλιά τιμή
παρεχόμενη τροφή																									
αριθμός ζώντων απογόνων δοχείο 1																									σύνολο
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
																									σύνολο
συνολική θνησιμότητα ενηλίκων †																									

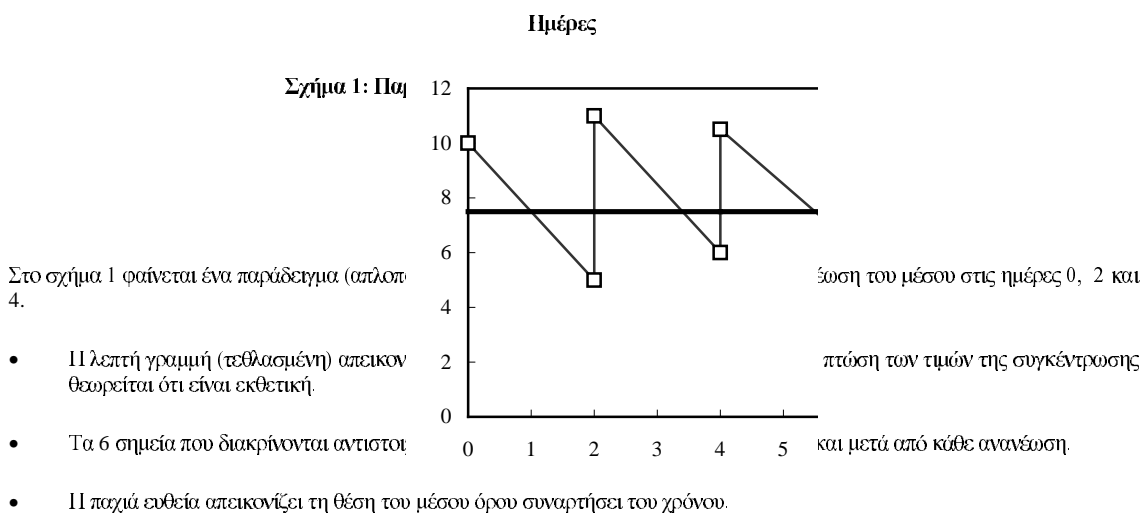
*Σημειώνεται πιο δοχείο χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα
 ‡Καταγράφεται στην αντίστοιχη θέση τυχόν θνησιμότητα ενηλίκων ατόμων
 †Καταγράφονται στην αντίστοιχη θέση τα αβγά των οποίων δεν ολοκληρώθηκε η ανάπτυξη

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΜΕΣΟΥ ΟΡΟΥ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Μέσος όρος συναρτήσεαι του χρόνου

4. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να μειωθεί στο χρονικό διάστημα ανάμεσα σε δύο διαδοχικές ανανέωσεις του μέσου, είναι απαραίτητο να εξετάζεται ποια συγκέντρωση πρέπει να επιλεγεί ως αντιπροσωπευτική της σειράς συγκεντρώσεων στις οποίες εκτίθενται οι γεννήτορες *Daphnia*. Η επιλογή πρέπει να βασιστεί τόσο σε βιολογικά όσο και σε στατιστικά κριτήρια. Εάν για παράδειγμα θεωρείται ότι η αναπαραγωγή επηρεάζεται περισσότερο από τη μέγιστη συγκέντρωση, τότε χρησιμοποιείται η μέγιστη συγκέντρωση. Εάν όμως θεωρείται ότι υπερισχύει η αθροιστική ή η μακροπρόθεσμη επίπτωση της τοξικής ουσίας, τότε κατάλληλότερη είναι μια μέση συγκέντρωση. Σε μια τέτοια περίπτωση, ενδείκνυται να χρησιμοποιηθεί ως μέσος όρος μια μέση τιμή συγκέντρωσης που υπολογίζεται συναρτήσεαι του χρόνου, αφού συνυπολογίζεται έτσι η χρονική διακύμανση της στιγμιαίας συγκέντρωσης.



Ο μέσος όρος συναρτήσεαι του χρόνου υπολογίζεται κατά τρόπο ώστε το εμβαδόν κάτω από την παχιά ευθεία (μέσος όρος συναρτήσεαι χρόνου) να ισούται με το εμβαδόν κάτω από την τεθλασμένη (καμπύλη των συγκεντρώσεων). Ο υπολογισμός για το παραπάνω παράδειγμα εμφανίζεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Υπολογισμός του μέσου όρου συναρτήσει του χρόνου (μέσος όρος TW)

αύξων αριθμός ανανέωσης	ημέρες	συγκέντρωση 0	συγκέντρωση 1	Ln (conc 0)	Ln (conc 1)	εμβαδόν	
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767	
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544	
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781	
σύνολο ημερών: 7						συνολικό εμβαδόν	50,091
						μέσος όρος (TW)	7,156

ημέρες: η διάρκεια μιας περιόδου ανανέωσης

Conc0: η συγκέντρωση που μετρείται στην αρχή εκάστης περιόδου ανανέωσης

Conc1: η συγκέντρωση που μετρείται στο τέλος εκάστης περιόδου ανανέωσης

Ln(conc0): ο φυσικός λογάριθμος της συγκέντρωσης 0

Ln(conc1): ο φυσικός λογάριθμος της συγκέντρωσης 1

εμβαδόν: το εμβαδόν κάτω από την εκθετική καμπύλη για κάθε περίοδο ανανέωσης, υπολογιζόμενο βάσει του τύπου

$$\text{εμβαδόν} = \frac{\text{Conc0} - \text{Conc1}}{\text{Ln}(\text{Conc0}) - \text{Ln}(\text{Conc1})} \times \text{ημέρες}$$

Ο μέσος όρος συναρτήσει του χρόνου (μέσος όρος TW) προκύπτει με διαίρεση του ολικού εμβαδού δια του συνολικού αριθμού ημερών.

Εννοείται ότι για τη δοκιμασία αναπαραγωγής *Daphnia* ο πίνακας επεκτείνεται για να καλύψει 21 ημέρες.

Είναι σαφές ότι όταν γίνεται παρατήρηση στην αρχή μόνο και στο τέλος κάθε περιόδου ανανέωσης, δεν υπάρχει δυνατότητα να επιβεβαιωθεί κατά πόσον η πτώση των τιμών της συγκέντρωσης ακολουθεί όντως εκθετική πορεία. Διαφορετική καμπύλη θα οδηγήσει σε διαφορετικό υπολογισμό του εμβαδού. Εντούτοις, μια εκθετική καμπύλη πτώσης των τιμών δεν αποκλείεται, είναι μάλιστα η προσφορότερη καμπύλη αν δεν υπάρχουν άλλες πληροφορίες.

Προσοχή χρειάζεται σε περίπτωση κατά την οποία δεν ανιχνευτεί καθόλου ουσία στο τέλος της περιόδου ανανέωσης. Είναι αδύνατον να προκύψει κάτω από την καμπύλη ένα εμβαδόν που να ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα, και συνεπώς ένας λογικός μέσος όρος TW, εκτός εάν υπάρχει τρόπος να εκτιμηθεί με τι ρυθμούς εξαφανίστηκε από το διάλυμα η ουσία.