I

(EY:n ja Euratomin perustamissopimuksia soveltamalla annetut säädökset, joiden julkaiseminen on pakollista)

ASETUKSET

KOMISSION ASETUS (EY) N:o 761/2009,

annettu 23 päivänä heinäkuuta 2009,

testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla annetun asetuksen (EY) N:o 440/2008 muuttamisesta sen mukauttamiseksi tekniikan kehitykseen

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta 18 päivänä joulukuuta 2006 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 ([1]) ja erityisesti sen 13 artiklan 3 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Komission asetuksessa (EY) N:o 440/2008 ([2]) vahvistetaan asetuksen (EY) N:o 1907/2006 soveltamiseksi käytettävät testimenetelmät, joilla määritellään aineiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, myrkyllisyys ja myrkyllisyys ympäristölle.

(2) On tarpeen muuttaa asetusta (EY) N:o 440/2008 tiettyjen testimenetelmien muuttamiseksi ja useiden OECD:n hyväksymien uusien testimenetelmien sisällyttämiseksi siihen. Sidosryhmiä on kuultu asiasta. Muutoksilla mukautetaan kyseessä olevia menetelmiä tieteen ja tekniikan kehitykseen.

(3) Höyrynpainetta koskevia säännöksiä olisi muutettava uuden effuusiomenetelmän sisällyttämiseksi.

(4) On tarpeen sisällyttää asetukseen uusi kuitujen halkaisijan pituuspainotetun geometrisen keskiarvon laskentamenetelmä.

(5) Asetusta (EY) N:o 440/2008 on syytä muuttaa ihoärsytystä koskevan uuden *in vitro* -menetelmän sisällyttämiseksi ensisijaisena vaihtoehtona, jotta koetarkoituksiin käytettävien eläinten määrää voitaisiin vähentää kokeisiin ja muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelua koskevien jäsenvaltioiden lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 24 päivänä marraskuuta 1986 annetun neuvoston direktiivin 86/609/ETY ([3]) mukaisesti. OECD:ssä keskustellaan luonnoksesta ihoärsytystä koskevaksi *in vitro* -menetelmäksi, mutta tässä poikkeustapauksessa on asianmukaista sisällyttää menetelmä B 46 tähän asetukseen. Menetelmä B 46 olisi ajantasaistettava heti kun se on mahdollista OECD:n päästyä asiassa ratkaisuun tai kun uudelleentarkastelun oikeuttavia lisätietoja on saatavilla.

(6) Levän inhibitiokokeita koskevia säännöksiä on muutettava uusien lajien sisällyttämiseksi sekä kemikaalien vaarallisuuden arviointia ja luokitusta koskevien vaatimusten täyttämiseksi.

(7) On tarpeen lisätä pintavedessä tapahtuvan aerobisen mineralisaation mittaamista koskeva uusi menetelmä eli biohajoavuuden simulointitesti sekä *Lemna*-sukuun kuuluvien lajien myrkyllisyyden arvioimista koskeva uusi menetelmä eli kasvunestymistesti.

([1]) EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.
([2]) EUVL L 142, 31.5.2008, s. 1.
([3]) EYVL L 358, 18.12.1986, s. 1.

(8) Sen vuoksi asetusta (EY) N:o 440/2008 olisi muutettava.

(9) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat asetuksen (EY) N:o 1907/2006 133 artiklalla perustetun komitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 440/2008 liite seuraavasti:

1) Muutetaan A kohta seuraavasti:

a) korvataan luku A.4 tämän asetuksen liitteessä I olevalla luvulla A.4;

b) lisätään tämän asetuksen liitteessä II oleva luku A.22.

2) Muutetaan B kohta seuraavasti:

Lisätään tämän asetuksen liitteessä III oleva luku B.46.

3) Muutetaan C osa seuraavasti:

a) korvataan luku C.3 tämän asetuksen liitteessä IV olevalla luvulla C.3;

b) lisätään tämän asetuksen liitteessä V ja VI olevat luvut C.25 ja C.26.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kolmantena päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 23 päivänä heinäkuuta 2009.

Komission puolesta
Stavros DIMAS
Komission jäsen

LIITE I

A.4. **HÖYRYNPAINE**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 104 (2004).

1.1 JOHDANTO

Tämä testimenetelmän A.4 (1) tarkistettu versio sisältää yhden uuden menetelmän. Kyseessä on effuusiomenetelmä: isoterminen termogravimetria, joka on kehitetty sellaisia aineita varten, joiden höyrynpaine on hyvin alhainen (arvoon 10^{-10} saakka). Koska uusia menetelmiä tarvitaan erityisesti sellaisten aineiden höyrynpaineen määrittämiseksi, joiden höyrynpaine on alhainen, muita tähän testimenetelmän kuuluvia menetelmiä arvioidaan uudelleen sen perusteella, voidaanko niitä käyttää muillakin määritysalueilla.

Termodynaamisen tasapainon vallitessa puhtaan aineen höyrynpaine vaihtelee ainoastaan lämpötilan funktiona. Perusperiaatteita käsitellään kirjallisuuslähteissä (2)(3).

Mitään yksittäistä mittausmenetelmää ei voida käyttää koko höyrynpainealueella arvoa 10^{-10} pienemmistä arvoista arvoon 10^5 Pa. Tähän testimenetelmään kuuluu kahdeksan höyrynpaineen mittausmenetelmää, joita voidaan käyttää eri höyrynpainealueilla. Eri menetelmiä verrataan niiden soveltuvuuden ja mittausalueen suhteen taulukossa 1. Menetelmiä voidaan käyttää ainoastaan sellaisten yhdisteiden tutkimiseen, jotka eivät hajoa testiolosuhteissa. Jos kokeellisia menetelmiä ei voida käyttää teknisistä syistä, höyrynpaine voidaan myös arvioida. Sopivaa arviointimenetelmää kuvataan tämän testimenetelmän lisäyksessä.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan aineen höyrynpaine on kiinteään tai nestemäiseen aineeseen ylhäältä kohdistuva kyllästyspaine.

Paineen SI-yksikkö on pascal (Pa), jota tulee käyttää tässä yhteydessä. Aiemmin käytetyt yksiköt ja niiden muuntokertoimet ovat seuraavat:

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

1 ilmakehä = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 baari (bar) = 10^5 Pa

Lämpötilan SI-yksikkö on kelvin (K). Celsius-asteet muunnetaan kelvineiksi seuraavan kaavan avulla:

$T = t + 273{,}15$

jossa T on kelvineinä ilmaistu termodynaaminen lämpötila ja t on lämpötila Celsius-asteina.

Taulukko 1

Mittausmenetelmä	Aineet		Arvioitu toistettavuus	Arvioitu uusittavuus	Suositeltu alue
	Kiinteät	Nestemäiset			
Dynaaminen menetelmä	Alhainen sulamispiste	Kyllä	Enintään 25 % 1–5 %	Enintään 25 % 1–5 %	10^3 Pa – 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa – 10^5 Pa
Staattinen menetelmä	Kyllä	Kyllä	5–10 %	5–10 %	10 Pa – 10^5 Pa 10^{-2} Pa – 10^5 Pa (1)
Isoteniskooppimenetelmä	Kyllä	Kyllä	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa – 10^5 Pa

Mittausmenetelmä	Aineet		Arvioitu toistettavuus	Arvioitu uusittavuus	Suositeltu alue
	Kiinteät	Nestemäiset			
Effuusiomenetelmä: höyrynpainevaaka	Kyllä	Kyllä	5–20 %	Enintään 50 %	10^{-3} – 1 Pa
Effuusiomenetelmä: Knudsen-kenno	Kyllä	Kyllä	10–30 %	—	10^{-10} – 1 P
Effuusiomenetelmä: isoterminen termogravimetria	Kyllä	Kyllä	5–30 %	Enintään 50 %	10^{-10} – 1 Pa
Kaasunkyllästysmenetelmä	Kyllä	Kyllä	10–30 %	Enintään 50 %	10^{-10} – 10^{3} Pa
Pyörivä roottori -menetelmä	Kyllä	Kyllä	10–20 %	—	10^{-4} – 0,5 Pa

(1) Käytettäessä kapasitanssimanometriä.

1.3 TESTIN PERIAATE

Höyrynpaine määritetään yleensä eri lämpötiloissa. Rajoitetulla lämpötila-alueella puhtaan aineen höyrynpaineen logaritmi on Clausiuksen ja Clapeyronin yksinkertaistetun yhtälön mukaan suoraan verrannollinen lämpötilan käänteisarvoon:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + vakio$$

jossa

p = höyrynpaine (Pa)

ΔHv = höyrystymislämpö (J mol^{-1})

R = yleinen kaasuvakio (8,314 J mol^{-1} K^{-1})

T = lämpötila (K).

1.4 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei tarvitse käyttää. Niitä käytetään lähinnä silloin, kun menetelmän toimivuutta tarkistetaan ajoittain tai kun eri menetelmillä saatuja tuloksia verrataan toisiinsa.

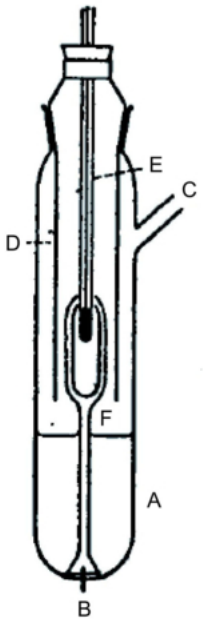
1.5 MENETELMIEN KUVAUS

1.5.1 **Dynaaminen menetelmä (Cottrellin menetelmä)**

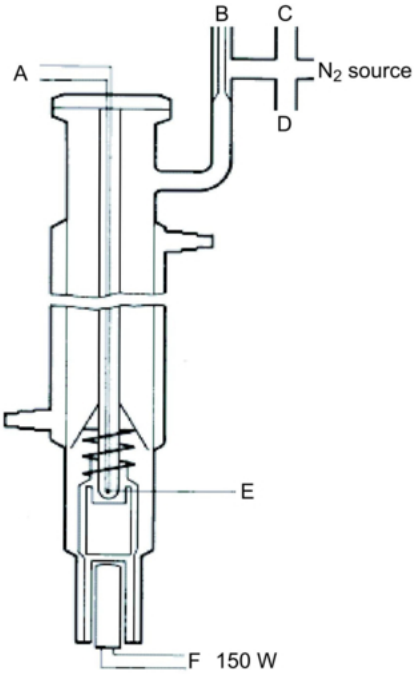
1.5.1.1 *Periaate*

Höyrynpaine määritetään mittaamalla aineen kiehumispiste useissa ennalta määrätyissä paineissa suunnilleen alueella 10^{3}–10^{5} Pa. Menetelmää suositellaan myös kiehumispisteen määritykseen, jossa sitä voidaan käyttää lämpötilaan 600 K saakka. Nesteiden kiehumispisteet ovat noin 0,1 °C suurempia 3–4 cm:n syvyydellä kuin pinnassa, mikä johtuu nestepatsaan hydrostaattisesta paineesta. Cottrellin menetelmässä (4) lämpömittari viedään nestepinnan yläpuolella olevaan höyryyn ja kiehuvaa nestettä pumpataan jatkuvasti lämpömittarin nupin yli. Nuppia peittää ohut nestekerros, joka on tasapainossa höyryn kanssa ilmakehän paineessa. Lämpömittari osoittaa siis todellisen kiehumispisteen ilman ylikuumennuksesta tai hydrostaattisesta paineesta johtuvia virheitä. Kuva 1 esittää Cottrellin alun perin käyttämää pumppua. Kiehuva neste on putkessa A. Putken pohjaan kiinnitetty platinalanka B tasoittaa kiehumista. Sivuputki C johtaa lauhduttimeen, ja vaippa D estää kylmää lauhdetta pääsemästä lämpömittarille E. Kun putkessa A oleva neste kiehuu, suppiloon jääneet kuplat ja neste huuhtovat pumpun F molempien haarojen kautta lämpömittarin nuppia.

Kuva 1



Kuva 2



Cottrellin pumppu (4)

A: Termopari

B: Tyhjiön puskuritilavuus

C: Painemittari

D: Tyhjiö

E: Mittauspiste

F: Lämmitysvastus, noin 150 W

1.5.1.2 *Laite*

Kuva 2 esittää hyvin tarkkaa, Cottrellin periaatteen mukaista laitetta. Laitteessa on putki, jonka alaosassa on kiehuntaosa, keskiosassa jäähdytin ja yläosassa ulostulo ja laippa. Cottrellin pumppu sijoitetaan kiehuntaosaan, jota kuumennetaan sähköpatruunalla. Lämpötila mitataan vaipallisella termoparilla tai vastuslämpömittarilla, joka viedään laitteen yläosassa olevan laipan kautta sisään. Ulostulo kytketään paineensäätöjärjestelmään, jossa on tyhjiöpumppu, puskuritilavuus, paineensäädin paineensäätöön tarvittavan typen johtamiseksi laitteeseen ja manometri.

1.5.1.3 *Menettely*

Näyte pannaan putken kiehuntaosaan. Jos näyte ei ole jauheena, mahdolliset ongelmat voidaan yrittää ratkaista kuumentamalla jäähdytysvaippaa. Laite suljetaan laipan kohdalta, ja näytteelle tehdään kaasunpoisto. Menetelmä ei sovellu vaahtoavien aineiden mittaukseen.

Tämän jälkeen asetetaan alin haluttu paine ja aloitetaan kuumennus. Lämpöanturi kytketään samalla rekisteröintilaitteeseen.

Järjestelmässä vallitsee tasapaino, kun vakiopaineessa mitattu kiehumislämpötila pysyy vakiona. Kiehumisen aikana on erityisesti vältettävä näytteen ”poukkoilua”. Lisäksi jäähdyttimellä on tapahduttava täydellinen tiivistyminen. Jos höyrynpaineen määritys tehdään kiinteälle aineelle, jonka sulamispiste on alhainen, on varottava lauhduttimen tukkeutumista.

Tasapainopisteen kirjaamisen jälkeen asetetaan uusi, suurempi paine. Mittauksia jatketaan 10^5 Pa:n paineeseen asti (yhteensä 5–10 mittausta). Tulokset tarkistetaan toistamalla mittaukset laskevassa painejärjestyksessä.

1.5.2 **Staattinen menetelmä**

1.5.2.1 *Periaate*

Staattisessa menetelmässä (5) mitataan tiettyä lämpötilaa vastaava höyrynpaine termodynaamisen tasapainon vallitessa. Menetelmä soveltuu kiinteiden ja nestemäisten yksi- tai monikomponenttiaineiden tutkimiseen alueella 10–10^5 Pa ja huolellisuutta noudattaen myös alueella 1–10 Pa.

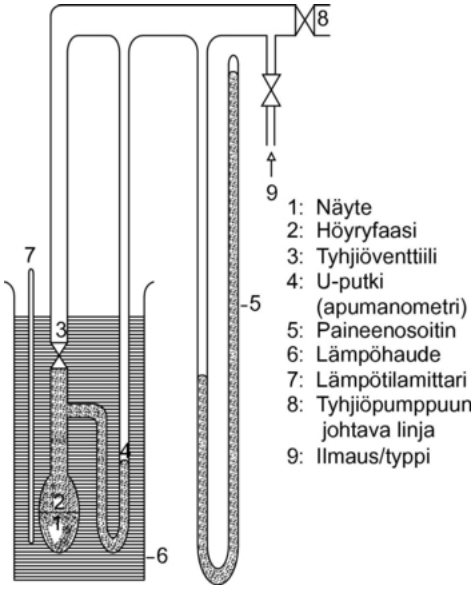
1.5.2.2 *Laite*

Laitteessa on vakiolämpöinen haude (tarkkuus ± 0,2 K), näyteastia, joka on liitetty tyhjiölinjaan, sekä manometri ja paineensäätöjärjestelmä. Näytekammio (kuva 3 a) on liitetty venttiilin välityksellä tyhjiölinjaan ja differentiaalimanometriin (sopivaa painemittarinestettä sisältävään U-putkeen), joka toimii nollaosoittimena. Differentiaalimanometrissa voidaan painealueen ja näytteen kemiallisen käyttäytymisen perusteella käyttää elohopeaa, silikoneja tai ftalaatteja. Elohopean käyttöä on kuitenkin vältettävä ympäristösyistä, jos se on mahdollista. Näyte ei saa mainittavassa määrin liueta U-putken nesteeseen tai reagoida sen kanssa. U-putken sijasta voidaan käyttää painemittaria (kuva 3 b). Manometrissa voidaan käyttää elohopeaa normaalista ilmanpaineesta 10^2 Pa:iin asti sekä silikoninesteitä ja ftalaatteja painealueella 10–10^2 Pa. Käytössä on myös muuntyyppisiä painemittareita alle 10^2 Pa:n mittauksia varten, ja kuumakalvomanometreja voidaan käyttää jopa alle 10^{-1} Pa:n paineessa. Lämpötila mitataan näyteastian ulkopuolelta tai astian sisältä.

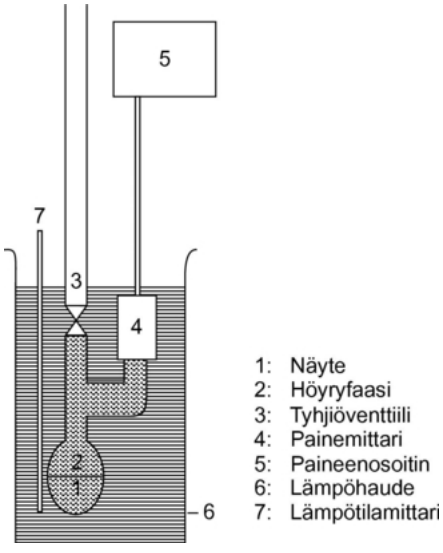
1.5.2.3 *Menettely*

Kuvan 3 a laitetta käytettäessä U-putki täytetään valitulla nesteellä, jolle on tehtävä kaasunpoisto korkeassa lämpötilassa ennen mittauksia. Näytettä pannaan laitteeseen ja sille tehdään kaasunpoisto alennetussa lämpötilassa. Jos näyte on monikomponenttinen, lämpötilan on oltava niin alhainen, ettei aineen koostumus muutu. Tasapaino voidaan saavuttaa nopeammin sekoittamalla näytettä. Näyte voidaan jäähdyttää nestemäisellä typellä tai hiilihappojäällä, mutta silloin on varottava ilmankosteuden tai pumppunesteen lauhtumista. Näyteastian venttiili avataan ja ilma poistetaan ylläpitämällä imua usean minuutin ajan. Ilmanpoisto toistetaan tarvittaessa useita kertoja.

Kuva 3 a



Kuva 3 b



Kun näytettä kuumennetaan venttiilin ollessa suljettu, höyrynpaine kasvaa, mikä vaikuttaa U-putken nestepatsaan tasapainoon. Tämä kompensoidaan päästämällä typpeä tai ilmaa laitteeseen, kunnes paine-eron osoitin palaa nollaan. Tähän vaadittava paine voidaan lukea manometristä tai tarkemmasta mittauslaitteesta. Paine vastaa näytteen höyrynpainetta kyseisessä mittauslämpötilassa. Käytettäessä kuvan 3 b laitetta höyrynpaineen lukema saadaan suoraan.

Höyrynpaine määritetään sopivin lämpötilavälein (yhteensä 5–10 mittausta) haluttuun maksimilämpötilaan asti.

Alhaisen lämpötilan mittaukset on toistettava tarkistuksen vuoksi. Jos toistomittauksista saadut tulokset eivät ole yhteneviä lämpötilan noston aikana saatujen tulosten kanssa, syy voi olla jokin seuraavista:

i) Näyte sisältää vielä ilmaa (esimerkiksi aineet, joiden viskositeetti on suuri) tai alhaisessa lämpötilassa kiehuvaa ainetta, joka vapautuu kuumentamisen aikana.

ii) Näytteessä tapahtuu kemiallinen reaktio (esimerkiksi hajoaminen tai polymerisoituminen) mitattavalla lämpötila-alueella.

1.5.3 **Isoteniskooppimenetelmä**

1.5.3.1 *Periaate*

Isoteniskooppimenetelmä (6) rakentuu staattisen menetelmän periaatteelle. Menetelmässä näyte pannaan isoteniskoopin laajennukseen, jota pidetään vakiolämpötilassa. Laajennus on liitetty manometriin ja tyhjiöpumppuun. Epäpuhtaudet, jotka ovat haihtuvampia kuin näyte, poistetaan tekemällä kaasunpoisto alennetussa paineessa. Näytteen höyrynpaine valituissa lämpötiloissa saatetaan tasapainoon inertin kaasun tunnetun paineen kanssa. Isoteniskooppi kehitettiin mittaamaan tiettyjen nestemäisten hiilivetyjen höyrynpainetta, mutta se soveltuu myös kiinteiden aineiden tutkimiseen. Menetelmä ei yleensä sovellu monikomponenttijärjestelmien tutkimiseen. Haihtumattomia epäpuhtauksia sisältävistä näytteistä saaduissa tuloksissa on vain pieniä virheitä. Suositeltava mittausalue on 10^2–10^5 Pa.

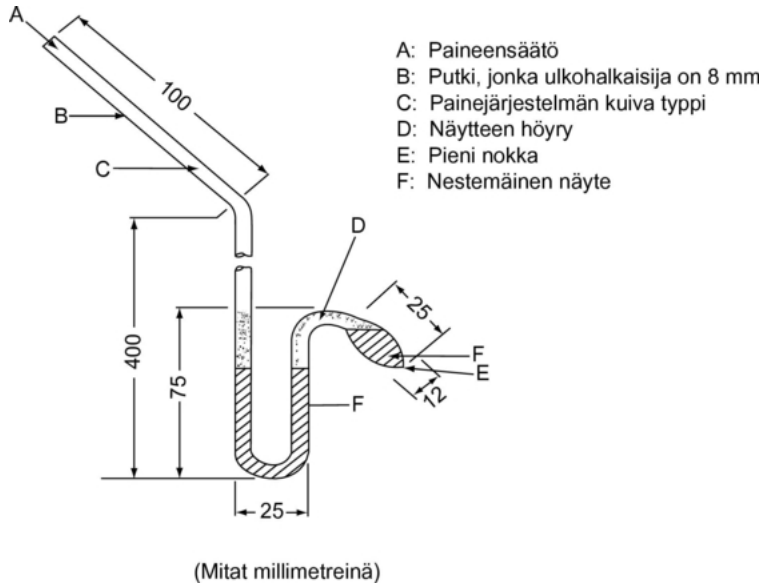
1.5.3.2 *Laite*

Kuvassa 4 on esimerkki mittauslaitteesta. Täydellinen kuvaus esitetään testimenetelmässä ASTM D 2879-86 (6).

1.5.3.3 *Menettely*

Nestemäiset näytteet toimivat samalla differentiaalimanometrin nesteenä. Isoteniskooppiin lisätään nestettä niin paljon, että sen laajennus ja manometrin lyhyempi jalka täyttyvät. Isoteniskooppi liitetään tyhjiöjärjestelmään ja siitä poistetaan ilma, minkä jälkeen se täytetään typellä. Tämä toistetaan kaksi kertaa hapenjäännösten poistamiseksi. Täytetty isoteniskooppi asetetaan vaaka-asentoon siten, että näyte leviää ohueksi kerrokseksi laajennuksessa ja manometrissa. Järjestelmän paine lasketaan arvoon 133 Pa ja näytettä kuumennetaan varovasti, kunnes se alkaa kiehua (näytteeseen liuenneiden kaasujen poisto). Isoteniskoopin asentoa muutetaan niin, että näyte palaa laajennukseen ja täyttää manometrin lyhyemmän jalan. Paine pidetään 133 Pa:ssa. Laajennuksen nokkaa kuumennetaan pienen liekin avulla, kunnes näytteestä vapautuu niin paljon höyryä, että näytettä työntyy laajennuksen yläosasta ja manometrin varresta isoteniskoopin manometriosaan, jolloin muodostuu höyrytäytteinen tila, jossa ei ole typpeä. Tämän jälkeen isoteniskooppi asetetaan hauteeseen, jonka lämpötila on vakio, ja typen painetta säädetään, kunnes se on sama kuin näytteen paine. Tässä tilanteessa typen ja näytteen höyrynpaine on sama.

Kuva 4



Kiinteiden aineiden tutkimiseen käytetään silikoninesteiden tai ftalaattien kaltaisia manometrinesteitä. Manometrinesteen valinta riippuu kulloisestakin paine- ja lämpötila-alueesta. Manometrineste, jolle on tehty kaasunpoisto, lisätään isoteniskoopin pidemmän varren pullistumaan. Näyte pannaan laajennukseen, ja sille tehdään kaasunpoisto korkeassa lämpötilassa, minkä jälkeen isoteniskooppia kallistetaan, kunnes manometrineste virtaa U-putkeen.

1.5.4 **Effuusiomenetelmä: höyrynpainevaaka** (7)

1.5.4.1 *Periaate*

Tutkittavasta aineesta otetaan näyte, jota kuumennetaan pienessä uunissa kelloastiassa, josta on poistettu ilma. Uuni on peitetty kannella, jossa on pieniä aukkoja, joiden halkaisijat tunnetaan. Höyry, joka vapautuu näytteestä yhden tällaisen aukon kautta, johdetaan samassa kelloastiassa olevan erittäin herkän vaa'an vaakakuppiin. Joissakin koejärjestelyissä vaakakupin ympärillä on jäähdytyslaatikko, joka johtaa lämmön ulkopuolelle. Vaakakuppi jäähdytetään säteilyn avulla, jotta vapautuva höyry tiivistyisi kupin pinnalle. Höyryvirran momentti toimii vaakaan kohdistuvana voimana. Höyrynpaine voidaan määrittää kahdella tavalla: suoraan vaakakuppiin kohdistuvasta voimasta tai haihtumisnopeudesta Hertzin ja Knudsenin yhtälön (2) avulla:

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

jossa:

G = haihtumisnopeus (kg s^{-1} m^{-2})

M = moolimassa (g mol^{-1})

T = lämpötila (K)

R = yleinen kaasuvakio (J mol^{-1} K^{-1})

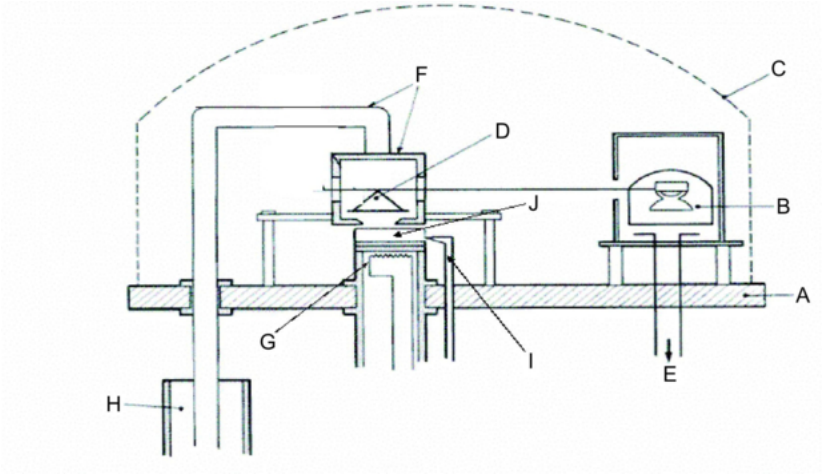
p = höyrynpaine (Pa)

Suositeltava mittausalue on 10^{-3}–1 Pa.

1.5.4.2 *Laite*

Kuva 5 havainnollistaa laitteen yleistä periaatetta.

Kuva 5



A: Aluslevy
B: Kiertokäämimittari
C: Kelloastia
D: Vaaka ja vaakakuppi
E: Tyhjiömittari
F: Jäähdytyslaatikko ja kylmätanko
G: Haihdutusuuni
H: Dewar-astia, jossa on nestemäistä typpeä
I: Näytteen lämpötilan mittaus
J: Näyte

1.5.5 **Effuusiomenetelmä: Knudsen-kenno**

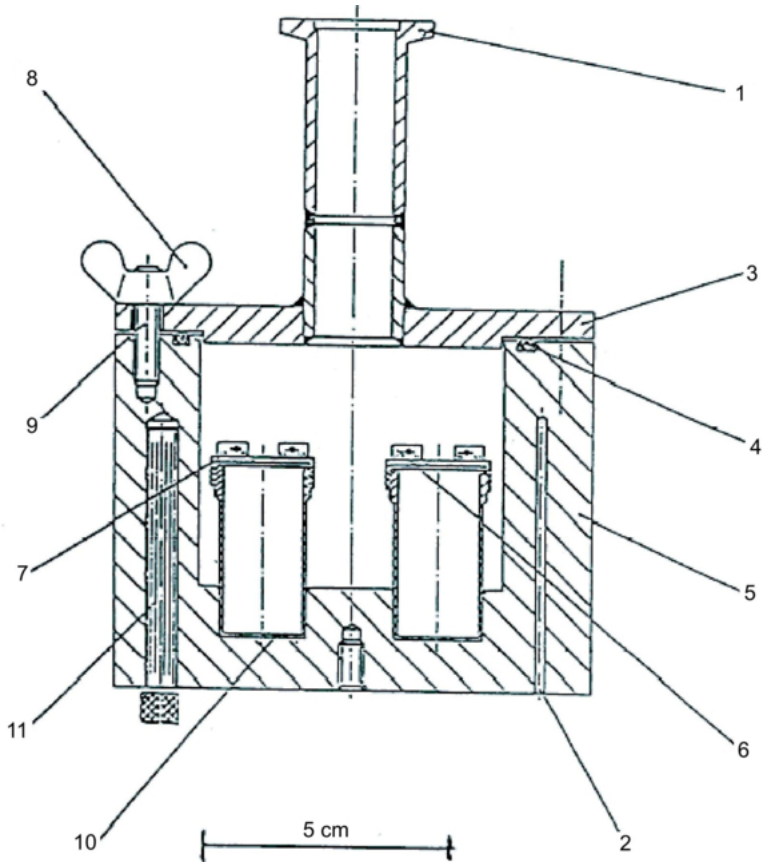
1.5.5.1 *Periaate*

Menetelmä perustuu Knudsen-kennosta (8) aikayksikköä kohti virtaavan, höyrymäisen näytteen massan mittaamiseen. Virtaus tapahtuu mikroaukon läpi ultratyhjiössä. Ulos virtaavan höyryn massa saadaan joko määrittämällä kennon painohäviö tai tiivistämällä höyry alhaisessa lämpötilassa, minkä jälkeen höyrystyneen aineen määrä voidaan määrittää kromatografian avulla. Höyrynpaine lasketaan Hertzin ja Knudsenin yhtälön avulla (ks. kohta 1.5.4.1) käyttämällä korjauskertoimia, jotka riippuvat laitteen parametreista (9). Suositeltava mittausalue on 10^{-10}–1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2 *Laite*

Kuva 6 havainnollistaa laitteen yleistä periaatetta.

Kuva 6



1: Tyhjiöliitäntä
2: Suojatasku platinavastuslämpömittaria tai lämpötilan mittausta ja säätöä varten
3: Tyhjiösäiliön kansi
4: O-rengas
5: Tyhjiösäiliö (alumiinia)
6: Effuusiokennojen asetus- ja poistolaite
7: Kierrekansi
8: Siipimutterit
9: Pultit
10: Effuusiokennot (ruostumatonta terästä)
11: Lämpöpatruuna

1.5.6 **Effuusiomenetelmä: isoterminen termogravimetria**

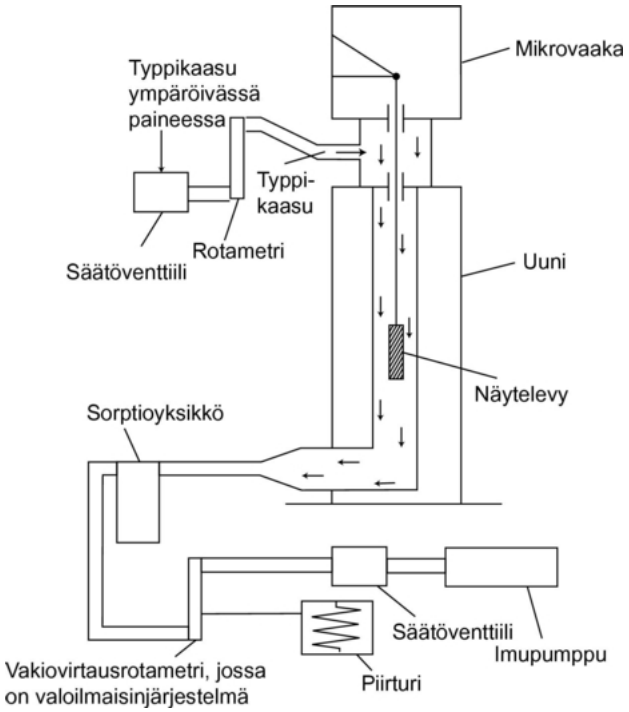
1.5.6.1 *Periaate*

Menetelmässä määritetään näytteen kiihdytetyt haihtumisnopeudet korkeissa lämpötiloissa ja ympäröivässä paineessa termogravimetrian avulla (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Haihtumisnopeudet v_T saadaan käsittelemällä valittua ainetta hitaasti virtaavalla inertillä kaasulla ja rekisteröimällä painohäviö tietyissä isotermisissä lämpötiloissa T (kelvineinä) tiettyjen ajanjaksojen kuluessa. Höyrynpaineet p_T lasketaan v_T-arvoista höyrynpaineen logaritmin ja haihtumisnopeuden logaritmin lineaarisen suhteen perusteella. Tarvittaessa voidaan tehdä ekstrapolointi lämpötiloihin 20 ja 25 °C tekemällä regressioanalyysi logaritmista p_T lämpötilan käänteisarvon 1/T suhteen. Menetelmällä voidaan tutkia aineita, joiden höyrynpaine voi olla niinkin alhainen kuin 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar). Tutkittavien aineiden puhtauden on oltava niin lähellä 100:aa prosenttia kuin mahdollista, jotta mitattuja painohäviöitä ei tulkittaisi väärin.

1.5.6.2 *Laite*

Kuva 7 havainnollistaa koejärjestelyn yleistä periaatetta.

Kuva 7



Lämpötilaohjatussa kammiossa olevaan mikrovaakaan ripustetun näytelevyn yli virtaa kuiva typpikaasu, joka kantaa näytteen höyrystyneet molekyylit mukanaan. Tultuaan ulos kammiosta kaasuvirta puhdistuu sorptioyksikössä.

1.5.6.3 *Menettely*

Näyte levitetään karhennetun lasilevyn pintaan tasaiseksi kerrokseksi. Jos näyte on kiinteä, se liuotetaan sopivalla liuottimella ja liuosta levitetään tasaisesti näytelevylle, joka kuivataan inertissä ympäristössä. Näin käsitelty levy ripustetaan mittausta varten termogravimetriseen analysaattoriin, ja sen painohäviötä mitataan jatkuvasti ajan funktiona.

Haihtumisnopeus v_T tietyssä lämpötilassa lasketaan näytelevyn painohäviöstä Δm seuraavalla kaavalla:

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

jossa F on levitetyn näytteen pinta-ala (yleensä näytelevyn pinta-ala) ja t on painohäviön Δm vaatima aika.

Höyrynpaine p_T lasketaan haihtumisnopeuden v_T funktiona seuraavan kaavan mukaan:

$$\mathrm{Log}\ p_T = C + D \log v_T$$

jossa C ja D ovat koejärjestelykohtaisia vakioita, jotka riippuvat mittauskammion halkaisijasta ja kaasun virtausnopeudesta. Vakiot on määritettävä kerran mittaamalla sarja yhdisteitä, joiden höyrynpaineet tiedetään, ja tekemällä regressio, jossa log v_T riippuu log p_T:stä (11)(21)(22).

Höyrynpaineen p_T ja kelvineinä ilmaistun lämpötilan T välinen suhde on seuraava:

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

jossa A ja B ovat vakioita, jotka on saatu muuttujien log p_T ja 1/T välisestä regressiosta. Yhtälön avulla voidaan laskea mitä tahansa lämpötilaa vastaava höyrynpaine käyttämällä ekstrapolointia.

1.5.7 **Kaasunkyllästysmenetelmä** (23)

1.5.7.1 *Periaate*

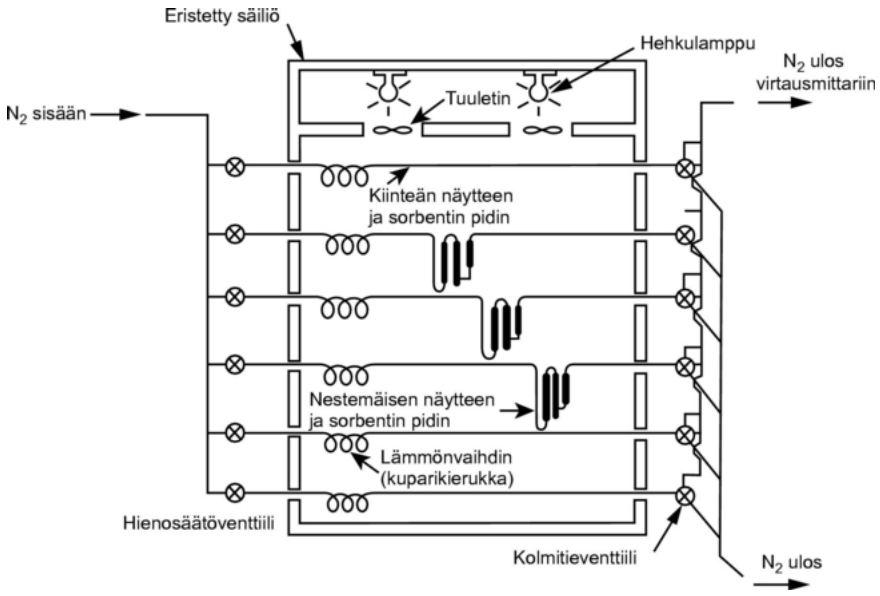
Inerttiä kaasua johdetaan huoneenlämpötilassa tietyllä virtausnopeudella näytteen läpi tai yli siten, että näytteen höyry ehtii kyllästää kaasun. Kaasufaasin kyllästyminen on ratkaisevan tärkeää. Kaasun kuljettama aine kerätään talteen, yleensä sorbentin avulla, ja sen määrä mitataan. Höyryn keräämisen ja sitä seuraavan analyysin sijasta kuljetettu ainemäärä voidaan määrittää myös suora-analyysin (esimerkiksi kromatografian) avulla. Höyrynpaine lasketaan olettaen, että ideaalikaasulaki on voimassa ja että kaasuseoksen kokonaispaine on yhtä kuin seoksessa olevien kaasujen paineiden summa. Näytteen osapaine eli höyrynpaine lasketaan kaasujen tunnetun kokonaistilavuuden ja kuljetetun aineen painon avulla.

Kaasunkyllästysmenetelmä soveltuu kiinteiden ja nestemäisten aineiden tutkimiseen. Sillä voidaan mitata höyrynpaineita arvoon 10^{-10} Pa saakka (10)(11)(12)(13)(14). Menetelmä on kaikkein luotettavin mitattaessa alle 10^3 Pa:n höyrynpaineita. Tätä suuremmilla arvoilla höyrynpaineet arvioidaan yleensä liian suuriksi, todennäköisesti aerosolien muodostumisen vuoksi. Koska höyrynpaineen mittaukset tehdään huoneenlämpötilassa, ei ole tarpeen ekstrapoloida korkeampia lämpötiloja koskevia tietoja. Tällaista ekstrapolointia vältetään, koska se voi aiheuttaa vakavia virheitä.

1.5.7.2 *Laite*

Menetelmässä käytetään säiliötä, jonka lämpötila on vakio. Kuvan 8 piirros esittää säiliötä, joka sisältää kolme kiinteän näytteen ja kolme nestemäisen näytteen pidintä. Niiden avulla kiinteästä tai nestemäisestä näytteestä voidaan tehdä kolme analyysiä. Lämpötila säädetään ± 0,5 °C:n tarkkuudella tai tarkemmin.

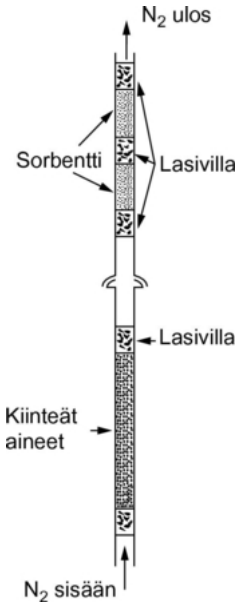
Kuva 8



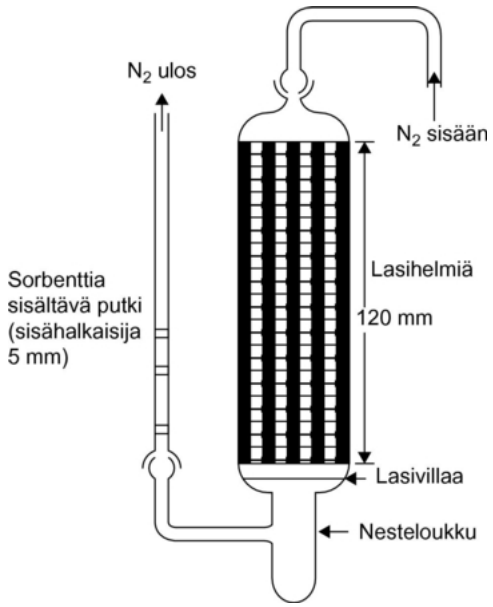
Inerttinä kantokaasuna käytetään yleensä typpeä, mutta joskus voidaan tarvita muutakin kaasua (24). Kantokaasun on oltava kuiva. Kaasuvirta jaetaan kuudeksi osavirraksi, joita säädetään neulaventtiileillä (aukot noin 0,79 mm) ja jotka johdetaan säiliöön kupariputkien kautta (sisähalkaisija 3,8 mm). Lämpötilatasoituksen jälkeen kaasu virtaa näytteen ja sorbenttiloukun läpi ja sen jälkeen ulos säiliöstä.

Kiinteä näyte pannaan lasiputkeen, jonka sisähalkaisija on 5 mm ja jossa on näytteen molemmin puolin lasivillatulpat (ks. kuva 9). Kuva 10 esittää nestemäisen näytteen pidintä ja sorbenttijärjestelmää. Nesteiden höyrynpaineiden mittauksissa parhaiten toistettavissa oleva menetelmä on valaa nestettä lasihelmien tai inertin sorbentin, kuten piidioksidin päälle ja täyttää näytteenpidin näillä helmillä. Vaihtoehtona on antaa kantokaasun kulkea karkean fritin kautta ja kuplia nestemäistä näytettä sisältävän kolonnin läpi.

Kuva 9



Kuva 10



Sorbenttijärjestelmässä on etummainen ja takimmainen sorptio-osa. Hyvin alhaisilla höyrypaineilla sorbentti pidättää vain pieniä ainemääriä, jolloin adsorboituminen lasivillaan sekä näytteen ja sorbentin välisen lasiputken seiniin voi olla vakava ongelma.

Toinen tehokas tapa kerätä höyrystynyt materiaali talteen on käyttää loukkuja, jotka jäähdytetään hiilihappojäällä. Ne eivät aiheuta kyllästymiskolonniin kohdistuvaa vastapainetta, ja niihin jääneen ainemäärän kerääminen on helppoa.

1.5.7.3 *Menettely*

Ulos virtaavan kantokaasun virtausnopeus mitataan huoneenlämpötilassa. Virtausnopeus tarkistetaan useita kertoja kokeen aikana, jotta kantokaasun kokonaistilavuudesta saadaan luotettava arvo. Jatkuva mittaus massavirtausmittarin avulla on suositeltavaa. Kaasufaasin kyllästyminen voi vaatia huomattavan pitkän kontaktiajan, minkä vuoksi kaasun virtausnopeuden on oltava suhteellisen pieni (25).

Kokeen lopussa sorbenttijärjestelmän molemmat osat analysoidaan erikseen. Niissä olevat aineet desorboidaan lisäämällä liuotinta. Näin saadut liuokset analysoidaan kvantitatiivisesti, jotta voidaan määrittää kummastakin osasta desorboituneen ainemäärän paino. Analyysimenetelmän (kuten myös sorbentin ja desorboivan liuottimen) valinta riippuu näytteen ominaisuuksista. Desorption tehokkuus määritetään ruiskuttamalla tunnettu määrä näytettä sorbenttiin, desorboimalla se ja analysoimalla näin saatu määrä. On tärkeää, että desorption tehokkuus tarkistetaan käyttämällä pitoisuutta, joka on sama tai lähes sama kuin näytteen pitoisuus koeolosuhteissa.

Kantokaasun kyllästyminen tutkittavalla aineella varmistetaan käyttämällä kolmea eri kaasunvirtausnopeutta. Kaasun oletetaan olevan kyllästynyt, jos laskettu höyrynpaine ei muutu eri virtausnopeuksilla.

Höyrynpaine lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa

p = höyrynpaine (Pa)

W = haihdutetun näytteen massa (g)

V = kyllästetyn kaasun tilavuus (m^3)

R = yleinen kaasuvakio (8,314 J mol^{-1} K^{-1})

T = lämpötila (K)

M = näytteen moolimassa (g mol^{-1}).

Mitatut tilavuudet on korjattava virtausmittarin ja kyllästimen välisten paine- ja lämpötilaerojen suhteen.

1.5.8 **Pyörivä roottori**

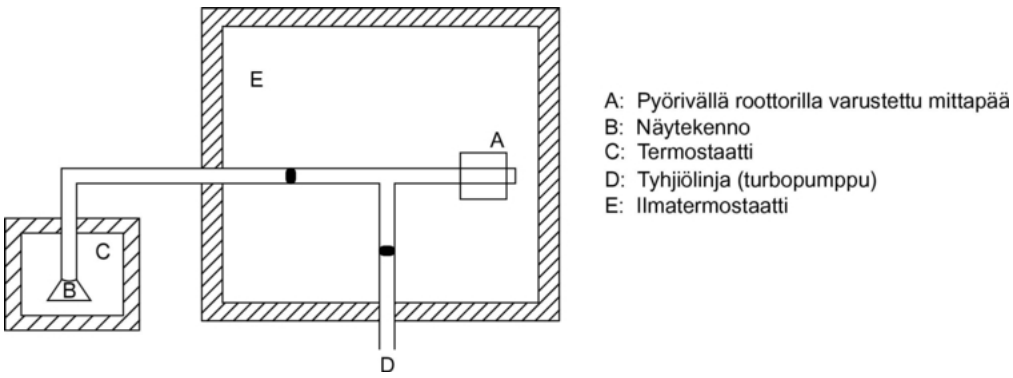
1.5.8.1 *Periaate*

Menetelmässä käytetään pyörivään roottoriin perustuvaa viskositeettimittaria, jossa mittauselementtinä on pieni teräspallo, joka leijuu magneettikentässä ja pyörii pyörivien kenttien vaikutuksesta (26)(27)(28). Pallon pyörimisnopeus saadaan anturikelojen avulla. Kun pallo on saavuttanut tietyn pyörimisnopeuden (yleensä noin 400 kierrosta sekunnissa), magnetointi lopetetaan, jolloin pyöriminen hidastuu kaasukitkan vaikutuksesta. Pyörimisnopeuden pienenemiset mitataan ajan funktiona. Höyrynpaine voidaan päätellä määrittämällä teräspallon nopeuden pieneneminen paineen vaikutuksesta. Suositeltava mittausalue on 10^{-4}–0,5 Pa.

1.5.8.2 *Laite*

Laitteen periaatepiirros on kuvassa 11. Mittapää on suljettu vakiolämpöiseen tilaan (säätötarkkuus 0,1 °C). Näytesäiliö asetetaan erilliseen koteloon (säätötarkkuus jälleen 0,1 °C), ja järjestelmän kaikkia muita osia pidetään lämmitettyinä tiivistymisen estämiseksi. Koko laite on liitetty tyhjiöjärjestelmään.

Kuva 11



2. **TIEDOT JA NIIDEN RAPORTOIMINEN**

2.1 TIEDOT

Kaikissa edellä kuvatuissa menetelmissä höyrynpaine määritetään vähintään kahdessa lämpötilassa. Lämpötila-alueella 0–50 °C suositellaan vähintään kolmea mittausta, jotta höyrynpainekäyrän lineaarisuus voitaisiin tarkistaa. Käytettäessä effuusiomenetelmää (Knudsen-kennoa tai isotermistä termogravimetriaa) tai kaasunkyllästysmenetelmää mittausten lämpötila-alueeksi suositetaan alueen 0–50 °C sijasta aluetta 120–150 °C.

2.2 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset,

— vähintään kaksi höyrynpaine- ja lämpötila-arvoa – ja mieluiten kolme tai enemmän – alueelta 0–50 °C (tai 120–150 °C),

— lämpötila-arvoista ainakin yhden on oltava 25 °C tai vähemmän, jos se on valitussa menetelmässä teknisesti mahdollista,

— kaikki lähtöarvot,

— käyrä, joka kuvaa log p:n ja lämpötilan käänteisarvon 1/T välistä riippuvuutta,

— arvio höyrynpaineesta 20 tai 25 °C:n lämpötilassa.

Jos aineessa tapahtuu muutoksia (olomuodon muutos, hajoaminen), on lisäksi ilmoitettava:

— muutoksen luonne,

— lämpötila, jossa muutos tapahtui ilmakehän paineessa,

— höyrynpaine 10 °C ja 20 °C muutoslämpötilan alapuolella sekä 10 °C ja 20 °C tämän lämpötilan yläpuolella (ellei kyseessä ole muutos kiinteästä olomuodosta kaasuksi).

Raportissa on esitettävä myös kaikki sellaiset tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

3. **KIRJALLISUUS**

(1) *Euroopan yhteisöjen virallinen lehti* L 383 A, s. 26–47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, Lontoo.

(3) Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

(5) NF T 20–048 AFNOR (syyskuu 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa – Static method.

(6) ASTM D 2879–86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20–047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

(8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521–532.

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, kahdestoista laitos (2000).

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22–28.

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269–278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117–122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137–147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974), 393–400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161–168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27–31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300–310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) 1512–20.

(21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

(23) 40 CFR, 796. (1993). s. 148–153, Office of the Federal Register, Washington DC.

(24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

(25) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

Lisäys

Arviointimenetelmä

JOHDANTO

Höyrynpaineen arvioituja arvoja voidaan käyttää, kun halutaan:

— päättää, mikä kokeellisista menetelmistä on sopiva,

— saada arvio tai raja-arvo tapauksissa, joissa kokeellista menetelmää ei voida käyttää teknisistä syistä.

ARVIOINTIMENETELMÄ

Nesteiden ja kiinteiden aineiden höyrynpaine voidaan arvioida muunnetun Watson-korrelaation (a) avulla. Ainoa tarvittava kokeellinen tieto on normaali kiehumispiste. Menetelmää voidaan käyttää painealueella 10^5–10^{-5} Pa.

Tarkemmat tiedot menetelmästä esitetään kirjassa "Handbook of Chemical Property Estimation Methods" (b). Ks. myös OECD Environmental Monograph No.67 (c).

LASKENTA

Höyrynpaine lasketaan seuraavasti:

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

jossa

T = kyseinen lämpötila

T_b = normaali kiehumispiste

P_{vp} = höyrynpaine lämpötilassa T

ΔH_{vb} = höyrystymislämpö

ΔZ_b = puristuvuustekijä (arvioitu arvo 0,97)

m = empiirinen kerroin, joka vaihtelee fysikaalisen olomuodon mukaan kyseisessä lämpötilassa.

Lisäksi

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

jossa K_F on empiirinen vakio, jolla otetaan huomioon aineen polaarisuus. Viitteessä (b) on lueteltu K_F-vakiot useille sekoitetyypeille.

Usein on saatavana tietoja kiehumispisteestä alennetussa paineessa. Tällöin höyrynpaine voidaan viitteen (b) mukaan laskea seuraavasti:

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

jossa T_1 on kiehumispiste alennetussa paineessa P_1.

RAPORTTI

Arviointimenetelmää käytettäessä raportissa on esitettävä yksityiskohtaiset selvitykset laskennasta.

KIRJALLISUUS

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

LIITE II

A.22. **KUITUJEN HALKAISIJAN PITUUSPAINOTETTU GEOMETRINEN KESKIARVO**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tässä testiohjeessa kuvataan menettely, jolla voidaan mitata bulkkimateriaalien tai -tuotteiden sisältämien keinotekoisten mineraalikuitujen halkaisijan pituuspainotettu geometrinen keskiarvo (LWGMD, Length Weighted Geometric Mean Diameter). Koska populaation LWGMD on 95 prosentin todennäköisyydellä 95 prosentin luottamustasojen välillä (LWGMD ± 2 x keskivirhe), kirjattu arvo (testin tulos) on näytteen alempi 95 prosentin luottamustaso (ts. LWGMD miinus kaksi keskivirhettä). Menetelmän perustana on tarkistettu versio (kesäkuu 1994) HSE:n (Health and Safety Executive, UK) teknisestä menetelmästä, josta sovittiin ECFIA:n (European Ceramic Fibres Industry Association) ja HSE:n välisessä kokouksessa Chesterissä 26.9.1993 ja joka kehitettiin toista laboratorioiden välistä koetta varten sekä kyseisen kokeen tulosten perusteella (1, 2). Kyseisellä mittausmenetelmällä voidaan määrittää kuidun halkaisija bulkkimateriaaleissa tai -tuotteissa, jotka sisältävät keinotekoisia mineraalikuituja, esimerkiksi tulenkestäviä keraamisia kuituja, keinotekoisia lasikuituja ja yksikide- tai monikidekuituja.

Pituuspainotuksella kompensoidaan vaikutusta, jonka pitkien kuitujen särkymisellä (näytteenoton tai käsittelyn yhteydessä) on halkaisijoiden kokojakaumaan. Keinotekoisten mineraalikuitujen kokojakaumaa määritettäessä käytetään geometrisia tilastomuuttujia (geometrista keskiarvoa), koska näiden halkaisijoiden kokojakaumat ovat yleensä lähellä logaritmista normaalijakaumaa.

Kaikkien kuitujen pituuden ja halkaisijan mittaaminen on pitkällistä ja aikaavievää, mutta jos vain ne kuidut mitataan, jotka koskettavat äärettömän ohutta viivaa pyyhkäisyelektronimikroskoopin tarkastelukentässä, määrätyn kuidun valinnan todennäköisyys on suhteessa kyseisen kuidun pituuteen. Koska pituus on tätä kautta otettu huomioon pituuspainotetuissa mittauksissa, ainoa tarvittava mittaus on halkaisijan mittaus, jotta voidaan määrittää LWGMD miinus kaksi keskivirhettä.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Hiukkanen: kappale, jonka pituus-leveyssuhde on alle 3:1

Kuitu: kappale, jonka pituus-leveyssuhde (muotosuhde) on vähintään 3:1.

1.3 SOVELTAMISALA JA RAJOITUKSET

Menetelmä on suunniteltu määrittämään halkaisijoiden kokojakaumat, kun keskihalkaisija on välillä 0,5 µm – 6 µm. Tätä suurempia halkaisijoita voidaan mitata käyttämällä pienempiä pyyhkäisyelektronimikroskoopin suurennuksia, mutta menetelmän tarkkuus vähenee siirryttäessä pienempiin halkaisijoihin. Jos keskihalkaisija on alle 0,5 µm, suositellaan läpäisyelektronimikroskoopin käyttöä.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Kuituhuovasta tai irtonaisesta bulkkikuidusta otetaan useita edustavia kairausnäytteitä. Näytteiden pituutta lyhennetään murskaamalla, ja edustava näyte dispergoidaan veteen. Näytteestä otetaan osanäytteet, jotka suodatetaan polykarbonaattisuodattimen läpi (huokoskoko 0,2 µm) ja preparoidaan pyyhkäisyelektronimikroskoopilla tehtävää tutkimusta varten. Kuitujen halkaisijat mitataan vähintään suurennuksella 10 000 x ([1]) käyttäen viivan leikkauspistettä käyttävää menetelmää, jotta keskihalkaisija voidaan estimoida harhattomasti. Alempi 95 prosentin luottamustaso määritetään (yksipuolisen testin perusteella), jotta saadaan estimaatti materiaalin kuitujen halkaisijan geometrisen keskiarvon alimmasta arvosta.

([1]) Suurennus on tarkoitettu 3 µm:n kuiduille; 6 µm:n kuiduille voi soveltua paremmin suurennus 5 000 ×.

1.5 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Turvallisuus ja varotoimet**

Fyysinen altistus ilmassa leijuville kuiduille on minimoitava ja kuivien kuitujen käsittelyssä on käytettävä veto- tai hansikaskaappia. Fyysistä altistusta on seurattava määrävälein, jotta voidaan määrittää turvamenetelmien tehokkuus. Keinotekoisia mieneraalikuituja käsiteltäessä on käytettävä kertakäyttöhansikkaita ihoärsytyksen ehkäisemiseksi ja ristikontaminaation estämiseksi.

1.5.2 **Laitteet**

— Puristin ja puristusmuotit (paine 10 MPa)

— polykarbonaattisuodattimet, joiden halkaisija on 25 mm ja joissa on kapillaarihuokoset (huokoskoko 0,2 μm)

— selluloosaesterisuodatin (huokoskoko 5 μm) varasuodattimena

— lasinen suodatuslaite (tai kertakäyttösuodatinjärjestelmä), joka soveltuu halkaisijaltaan 25 mm:n kokosille suodattimille (esim. Milliporen lasinen mikroanalyysijärjestelmä, tyyppi XX10 025 00)

— vastatislattu vesi, joka on suodatettu (huokoskoko 0,2 μm) mikro-organismien poistamiseksi

— päällystyslaite (kulta tai kulta/palladium)

— pyyhkäisyelektronimikroskooppi, jonka erotuskyky 10 nm ja suurennus 10 000 x

— spaattelit, skalpelli (tyyppi 24), pinsetit, pyyhkäisyelektronimikroskoopin putket, hiililiima tai -teippi, kolloidinen hopea

— ultraäänisondi tai ultraäänihaude

— kairauslaite tai korkkipora kairausnäytteiden ottamiseksi kuituhuovasta.

1.5.3 **Testimenettely**

1.5.3.1 *Näytteenotto*

Kuituhuovasta tai -levystä otetaan näytteet 25 mm:n kairalla tai korkkiporalla. Näytteet pitäisi ottaa tasaisin välimatkoin, jos huopa on lyhyt, tai sattumanvaraisesti valituilta alueilta, jos huopa on pitkä. Samoja välineitä voidaan käyttää sattumanvaraisten näytteiden ottamiseksi irrallisesta kuidusta. Näytteitä on mahdollisuuksien mukaan otettava kuusi siten, että otetaan huomioon bulkkimateriaalin spatiaalinen vaihtelu.

Kaikki kuusi kairausnäytettä murskataan halkaisijaltaan 50:mm kokoisessa puristusmuotissa paineella 10 Mpa. Materiaali sekoitetaan spaattelilla ja puristetaan uudelleen paineella 10 MPa. Sen jälkeen materiaali poistetaan puristusmuotista ja varastoidaan sinetöityyn lasipulloon.

1.5.3.2 *Näytteiden preparointi*

Orgaaninen sideaine voidaan tarvittaessa poistaa panemalla kuitu uuniin (lämpötila 450 °C) noin tunniksi.

Näytteestä muodostetaan kartio, joka ositetaan neljään osaan (tämä olisi tehtävä vetokaapin sisällä).

Pieni määrä < 0,5 g) näytettä lisätään spaattelilla 100 ml:aan vastatislattua vettä, joka on suodatettu kalvosuodattimen läpi (huokoskoko 0,2 μm) (myös muulla tavalla valmistettua ultrapuhdasta vettä voidaan käyttää, jos sen voidaan osoittaa olevan tarkoitukseen sopivaa). Näyte dispergoidaan kokonaan ultraäänisondilla, jota käytetään 100 W:n teholla ja sellaisella säädöllä, että syntyy kavitaatiota. (Jos sondia ei ole käytettävissä, käytetään seuraavaa menetelmää: ravistellaan ja käännellään ylösalaisin 30 sekunnin ajan, pannaan viideksi minuutiksi ultraäänihauteeseen ja ravistellaan ja käännellään ylösalaisin uudelleen 30 sekunnin ajan.)

Välittömästi näytteen dispergoinnin jälkeen siitä otetaan osanäytteet (esim. kolme näytettä, 3, 6 ja 10 ml) käyttämällä leveäsuista pipettiä (kapasiteetti 2–5 ml).

Kukin osanäyte suodatetaan polykarbonaattivakuumisuodattimella (huokoskoko 0,2 µm), jonka yhteydessä on MEC-varmistussuodatin (huokoskoko 5 µm), käyttämällä 25 mm:n lasista suodatinsuppiloa, jossa on sylinterimäinen säiliö. Suppiloon pannaan noin 5 ml suodatettua tislattua vettä, ja osanäyte pipetoidaan hitaasti veteen pitäen pipetin päätä meniskuksen alla. Pipetti ja säiliö huuhdellaan perusteellisesti pipetoinnin jälkeen, koska ohuet kuidut jäävät usein pintoihin.

Suodatin poistetaan varovasti ja erotetaan varmistussuodattimesta ennen sen asettamista kuivumaan.

Suodatinkalvolla olevasta saostumasta leikataan neljäsosa tai puolet skalpellilla (tyyppi 24) käyttämällä edestakaista liikettä. Leike kiinnitetään varovasti pyyhkäisyelektronimikroskoopin näytealustalle hiiliteipillä tai -liimalla. Kolloidihopeaa aplikoidaan vähintään kolmeen paikkaan, jotta sähkökontakti olisi parempi suodattimen ja näytealustan reunoilla. Kun liima tai kolloidinen hopea on kuivunut, kerroksen pinta päällystetään kullalla tai kulta-palladiumseoksella (paksuus noin 50 nm).

1.5.3.3 *Pyyhkäisyelektronimikroskoopin kalibrointi ja käyttö*

1.5.3.3.1 Kalibrointi

Pyyhkäisyelektronimikroskoopin kalibrointi on tarkistettava vähintään kerran viikossa (mieluiten kerran päivässä) käyttämällä sertifioitua kalibraattoria. Kalibrointi on tarkistettava sertifioituihin standardiarvoihin nähden, ja jos mitattu arvo ei ole ± 2 % sertifioidusta arvosta, kalibrointia on säädettävä ja se on tarkistettava uudelleen.

Pyyhkäisyelekronimikroskoopin erotuskyvyn on oltava vähintään sellainen, että sillä pystytään erottamaan 0,2 µm:n halkaisija (aito näytematriisi), kun suurennus on 2 000 x.

1.5.3.3.2 Käyttö

Pyyhkäisyelektronimikroskooppia pitäisi käyttää suurennuksella 10 000 x olosuhteissa ([1]), jotka mahdollistavat hyvän erotuskyvyn hitailla pyyhkäisynopeuksilla (esim. 5 sekuntia/pyyhkäisy). Vaikka eri pyyhkäiselektronimikroskooppien käyttövaatimukset voivat vaihdella, parhaan näkyvyyden ja erotuskyvyn aikaansaamiseksi atomipainoltaan suhteellisen kevyillä materiaaleilla olisi käytettävä kiihdytysjännitettä 5–10 keV sekä pientä pyyhkäisypisteen kokoa ja lyhyttä työskentelyetäisyyttä. Suoritettaessa lineaarista pyyhkäisyä pitäisi käyttää 0°:n kallistuskulmaa uudelleenfokusoinnin minimoimiseksi, tai jos pyyhkäisyelektronimikroskoopissa on eusentrinen objektipöytä, tulisi käyttää eusentristä työskentelyetäisyyttä. Pienempää suurennusta voidaan käyttää, jos materiaali sisältää ainostaan suuria kuituja (halkaisija > 5 µm).

1.5.3.4 *Koon määritys*

1.5.3.4.1 Tutkimus pienillä suurennuksilla näytteen arvioimiseksi

Näyte arvioidaan aluksi pienillä suurennuksilla. Tällöin tarkistetaan, onko näytteessä suurien kuitujen rykelmiä, ja arvioidaan kuitujen tiheys. Jos kuidut esiintyvät paljon rykelminä, suositellaan uuden näytteen ottamista.

Tilastotulosten luotettavuuden takaamiseksi on mitattava riittävästi kuituja. Suuri kuitujen tiheys voi näyttää tämän vuoksi tarpeelliselta, koska tyhjien kenttien tutkimimen on aikaavievää eikä tue analyysiä. Jos suodatin on kuitenkin ylikuormattu, on vaikea mitata kaikkia mitattavissa olevia kuituja, ja koska suuret kuidut voivat peittää näkyvistä pienemmät kuidut, pienemmät kuidut voivat jäädä mittaamatta.

LWGMD-arvon yliarvioiminen voi johtua kuitujen tiheyksistä, jotka ovat yli 150 kuitua yhtä lineaarisen pyyhkäisyn millimetriä kohti. Toisaalta pienet tiheydet pidentävät analyysiin tarvittavaa aikaa. Siksi on usein kustannustehokkaampaa preparoida näyte, jossa kuitujen tiheys on lähempänä optimia, kuin jatkaa mittauksia tiheyden ollessa pieni. Optimitiheys on sellainen, että yhtä näkökenttää kohti on keskimäärin yksi tai kaksi mitattavissa olevaa kuitua suurennuksella 5 000 x. Optimitiheys riippuu kuitenkin kuitujen koosta (halkaisijasta), joten tutkijan on harkittava, onko kuitujen tiheys optimaalinen vai ei.

([1]) 3 µm:n kuitujen osalta ks. edellinen alaviite.

1.5.3.4.2 Kuitujen halkaisijan pituuspainotus

Vain ne kuidut lasketaan, jotka koskettavat (äärettömän) ohutta viivaa (tai leikkaavat sen) pyyhkäisyelektronimikroskoopin näkökentässä. Tätä varten näkökentän keskustan yli vedetään vaakasuora (tai pystysuora) viiva.

Vaihtoehtoisesti näkökentän keskelle asetetaan yksi piste ja käynnistetään jatkuva pyyhkäisy yhteen suuntaan suodattimen yli. Jokainen kuitu, jonka muotosuhde on yli 3:1 ja joka koskettaa tätä pistettä tai leikkaa sen, mitataan ja kirjataan.

1.5.3.4.3 Kuitujen koon määritys

Suositellaan, että vähintään 300 kuitua mitataan. Kukin kuitu mitataan vain kerran kohdassa, jossa se leikkaa kentässä olevan viivan tai pisteen (tai leikkauskohtaa lähellä olevassa kohdassa, jos kuidun reunat peittyvät näkyvistä). Jos kuidun poikkileikkaukset eivät ole kauttaaltaan samat, on käytettävä mittausta, joka edustaa kuidun keskiarvoa. Reuna on määriteltävä huolellisesti ja mitattava lyhyin välimatka kuidun reunojen välillä. Mittaukset voidaan tehdä suoraan tai (valo)kuvista. Käytettäväksi suositellaan puoliautomaattisia mittausjärjestelmiä, jotka lataavat tiedot suoraan laskentataulukkoon, koska ne säästävät aikaa, eliminoivat kopiointivirheiden mahdollisuuden, ja laskenta voidaan automatisoida.

On tarkistettava pienellä suurennuksella, että pitkien kuitujen päät eivät kierry takaisin mittauskenttään ja että ne mitataan vain kerran.

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Kuitujen halkaisijat eivät tavallisesti edusta normaalijakaumaa. Logaritmimuunnoksen avulla on kuitenkin mahdollista saada jakauma, joka on lähellä normaalijakaumaa.

Lasketaan n kuitujen halkaisijan (D) luonnollisten logaritmien (lnD) aritmeettinen keskiarvo (keskiarvo lnD) ja keskihajonta (SD_{lnD}).

$$\text{mean } \ln D = \frac{\Sigma \ln D}{n} \tag{1}$$

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma\left(\ln D - \text{mean } \ln D\right)^2}{n-1}} \tag{2}$$

Keskihajonta jaetaan mittausten lukumäärän (n) neliöjuurella keskivirheen (SE_{lnD}) määrittämiseksi.

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \tag{3}$$

Vähennetään keskiarvosta 2 x keskivirhe ja määritetään tämän arvon (keskiarvo miinus 2 x keskivirhe) eksponenttiarvo, mikä antaa geometrisen keskiarvon miinus 2 x geometrinen keskivirhe.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mittl. } \ln D - 2SE_{lnd})} \tag{4}$$

3. **RAPORTOINTI**

TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava ainakin seuraavat tiedot:

— arvo LWGMD miinus 2 x keskivirhe

— mahdolliset poikkeamiset testimenettelystä (erityisesti ne, joilla voi olla vaikutusta tulosten tarkkuuteen tai luotettavuuteen) perusteluineen.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

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

LIITE III

B.46 REKONSTRUOITUA IHMISORVASKESIMALLIA KÄYTTÄVÄ *IN VITRO* -IHOÄRSYTTÄVYYSTESTI

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Ihoärsytyksellä tarkoitetaan korjautuvan ihovaurion syntymistä enintään neljä tuntia kestäneen testiaineen annostelun jälkeen [kuten on määritelty Yhdistyneiden Kansakuntien (YK) GHS-järjestelmässä (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures)] (1). Tässä testimenetelmässä vahvistetaan *in vitro* -menettely, jota tietovaatimuksista riippuen voidaan käyttää luotettavasti yksittäisenä korvaavana testinä aikaisempaan näyttöön perustuvassa testausstrategiassa aineiden aiheuttaman ihoärsytyksen määrittämiseen (2).

Ihoärsyttävyyden arviointi on tyypillisesti edellyttänyt koe-eläinten käyttöä (ks. menetelmä B.4) (3). Eläinten hyvinvointiin liittyvien näkökohtien osalta voidaan todeta, että menetelmällä B.4 ihosyövyttävyys ja ihoärsyttävyys voidaan määritellä soveltamalla vaiheittaista testausstrategiaa käyttäen *in vitro* ja *ex vivo* -menetelmiä, joita käyttämällä vältetään eläimille aiheutuva kipu ja kärsimys. Kolme validoitua *in vitro* -testimenetelmää tai -testausohjetta, eli B.40, B.40bis ja TG 435 (4, 5, 6) ovat hyödyllisiä B.4:n vaiheittaisen testausstrategia syövyttävyysosiossa.

Tämä testimenetelmä perustuu rekonstruoituun ihmisorvaskesimalliin, jonka kokonaissuunnittelu (ihmisestä peräisin olevan orvaskeden keratinosyyttien käyttäminen solujen lähteenä ja edustava kudos- ja soluarkkitehtuuri) jäljittelee läheisesti ihmisihon ylemmän kerroksen eli epidermiksen biokemiallisia ja fysiologisia ominaisuuksia. Tässä testimenetelmässä esiteltävällä menettelyllä ärsyttävien aineiden aiheuttamat vaarat voidaan tunnistaa YK:n GHS-luokan 2 mukaisesti. Tähän testimenetelmään sisältyy myös sarja suoritusvaatimuksia, joilla voidaan arvioida samanlaisia ja muunnettuja rekonstruoituun ihmisorvasketeen perustuvia testimenetelmiä (7).

Kahden *in vitro* -testimenetelmän (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), joissa käytetään rekonstruoitua ihmisorvaskesimallia ja jotka ovat kaupallisesti saatavilla nimillä EpiSkin™ ja EpiDerm™, osalta on saatu päätökseen validointia edeltävää vaihetta, optimointia ja validointia koskevat tutkimukset. Nämä perustuvat riskilausekkeeseen R.38. Tiettyjä GHS-järjestelmän tarkoituksiin tehtävien laskelmien on käsitelty kirjallisuuslähteessä 25. Menetelmiä, joiden suorituskyky on vastaava kuin EpiSkin™-menetelmän (validoitu vertailumenetelmä 1), suositellaan käytettäväksi erillisenä kanin *in vivo* -testin korvaavana testimenetelmänä luokiteltaessa GHS-luokkaan 2 kuuluvia ärsytystä aiheuttavia kemikaaleja. Menetelmiä, joiden suorituskyky on vastaava kuin EpiDerm™-menetelmän (validoitu vertailumenetelmä 2), suositellaan käytettäväksi ainoastaan seulontatestimenetelmänä tai osana vaiheittaista aikaisempaan näyttöön perustuvaa testausstrategiaa luokiteltaessa GHS-luokkaan 2 kuuluvia ärsytystä aiheuttavia aineita. Ennen kuin ehdotettua ihoärsyttävyyttä selvittävää rekonstruoitua ihmisorvaskesimallia käyttävää *in vitro* -testiä voidaan käyttää sääntelytarkoituksiin, olisi sen luotettavuus, merkittävyys (tarkkuus) ja ehdotetun käytön rajoitukset määritettävä, jotta voidaan varmistaa, että sitä voidaan verrata validoituun vertailumenetelmään 1 tässä testimenetelmässä (liite) vahvistettujen suoritusvaatimusten mukaisesti.

Kaksi muuta rekonstruoitua ihmisorvaskettä käyttävää *in vitro* -testimenetelmää on validoitu tämän testimenetelmän vaatimusten mukaisesti. Niillä on saatu vastaavia tuloksia kuin validoidulla vertailumenetelmällä 1 (18). Nämä ovat muutettu EpiDerm™ -testimenetelmä (muutettu vertailumenetelmä 2) ja SkinEthic RHE™ -testimenetelmä (ns. me-too-menetelmä 1).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä sovelletaan seuraavia määritelmiä:

Tarkkuus: testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Se on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-alueista. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Erän kontrolliaine: vertailuaine, jolla saadaan kudoksen solujen elinkyvyn keskimääräinen taso.

Solujen elinkyky: muuttuja, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta esim. solujen mitokondrioiden dehydrogenaasien kykyä pelkistää väriaine MTT (3–(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrasoliumbromidi, tiatsolyylisininen), joka mittaussuureesta ja testimenetelmästä riippuen korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn.

ET_{50}: altistusaika, joka tarvitaan, jotta solujen elinkyky vähenee 50 % applikoitaessa merkkiainetta tietyssä, määrätyssä pitoisuudessa, ks. myös IC_{50}.

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Se on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Niiden negatiivisten aineiden (muut kuin tehoaineet) osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Se on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Rajoittamaton annos: Iholle applikoidun testiaineen määrä, joka ylittää määrän, joka tarvitaan ihopinnan peittämiseksi kokonaisuudessaan ja tasaisesti.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä luokitellaan aineet ja seokset fysikaalisten, terveyteen ja ympäristöön liittyvien vaarojen standardityyppien ja -tasojen mukaisesti ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien kielteisistä vaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljettajille, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1) ja pantu täytäntöön EU:ssa asetuksella (EY) N:o 1272/2008.

IC_{50}: Pitoisuus, jossa merkkiaine alentaa solujen elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) sovitun altistusajan jälkeen, ks. myös ET_{50}.

Suoritusvaatimukset: Validoituihin vertailumenetelmiin perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Siihen sisältyvät I) testimenetelmän oleelliset osat; vähimmäisluettelo vertailuaineista, jotka on valittu niiden aineiden joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja III) verrattavissa olevat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka perustuvat siihen validoidusta vertailumenetelmästä saatuihin tuloksiin, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailuaineiden vähimmäisluettelon avulla.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa menettelyä. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten aineiden osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokiteltuja tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. On tärkeää ottaa herkkyys huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/muiden kuin aktiivisten aineiden osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokiteltuja tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. On tärkeää ottaa spesifisyys huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä.

Ihoärsyttävyys: Palautuvan ihovaurion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testiaineen annostelun jälkeen. Ihoärsytys on paikallisesti esiintyvä, ei-immunogeeninen reaktio, joka kehittyy pian stimulaation jälkeen (24). Sen tärkeimmät ominaispiirteet ovat sen palautuvuus, johon liittyy tulehdusreaktioita, ja useimmat tulehdusreaktioon liittyvät ärsyttävyyden kliiniset ominaispiirteet (eryteema, ödeema, kutina ja kipu).

1.3 SOVELTAMISALA JA RAJOITUKSET

Tähän testimenetelmään kuuluvan rekonstruoitua ihmisorvaskettä koskevan testin rajoitus on, että siinä luokitellaan aineet ihoärsytystä aiheuttaviksi ainoastaan YK:n GHS-luokan 2 mukaisesti. Koska aineiden luokittelu vaihtoehtoiseen YK:n GHS-luokkaan 3 ei ole mahdollista, jäljelle jääviä aineita ei luokitella lainkaan. Sääntelytarpeista ja mahdollisten uusien tulostapahtumien lisäämisestä me-too-kokeiden parantamisesta tai uusien kehittämisestä riippuen tätä testimenetelmää voidaan joutua tarkistamaan.

Tällä testimenetelmällä voidaan tunnistaa ärsytystä aiheuttavien yhdestä ainesosasta koostuvien aineiden aiheuttamat vaarat (19), mutta se ei tarjoa riittävästi tietoa ihon syöpymisestä. Sillä ei voida testata kaasuja ja aerosoleja, eikä seoksia ole vielä arvioitu validointitutkimuksessa.

1.4 TESTIN PERIAATE

Testiainetta applikoidaan paikallisesti kolmiulotteiseen rekonstruoituun ihmisorvaskesimalliin, joka koostuu ihmisestä saaduista tavallisista orvaskeden keratinosyyteistä, jotka on viljelty ihmisen orvaskeden monikerroksiseksi, täysin erilaistuneitten solujen malliksi. Se koostuu järjestyneistä ja selkeistä tyvisolu-, okasolu- ja jyväiskerroksista ja monikerroksisesta marraskedestä, joka sisältää solujenvälisiä lapellaarisia lipidikerroksia, jotka ovat järjestäytyneet samanlaisiin kuvioihin, kuin *in vivo* -kokeissa muodostuneet kuviot.

Rekonstruoitua ihmisorvaskettä koskevan mallimäärityksen periaate perustuu oletukseen, jonka mukaan syövyttäviä aineita ovat ne, jotka pystyvät läpäisemään marraskeden diffundoitumalla ja ovat myrkyllisiä soluille alla olevissa kerroksissa. Solujen elinkyvyn mittaus perustuu siihen, että dehydrogenaasi muuntaa väriaine MTT:n [[3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrasoliumbromidi, tiatsolyylisininen, Einecs-nro 206-069-5, CAS-nro 298-93-1] siniseksi formatsaanisuolaksi, joka mitataan määrällisesti, kun se on uutettu kudoksista (20). Ärsytystä aiheuttavat aineet tunnistetaan niiden kyvystä alentaa solun elinkykyä määriteltyjen kynnysarvojen (esim. ≤ 50 % YK:n GHS-luokka 2:n ärsyttävät aineet) alle. Sellaisia aineita, joiden yhteydessä solujen elinkyky on yli määritellyn kynnysarvon (esim. > 50 %, ei luokitusta), ei luokitella.

Rekonstruoitua ihmisorvaskettä voidaan käyttää esimerkkimenetelmänä testattaessa kiinteitä aineita, nesteitä, puolikiinteitä aineita tai vahamaisia aineita. Nesteet voivat olla vesiliukoisia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kiinteät aineet olisi mahdollisuuksien mukaan testattava hienona jauheena. Rekonstruoidun ihmisorvaskeden esimerkkimenetelmän validoinnissa käytettiin 58 tarkkaan valittua ainetta, jotka edustavat monia eri kemiallisia luokkia, joten on odotettavissa, että testiä sovelletaan yleisesti eri kemiallisissa luokissa (16). Validointiin kuuluu 13 GHS-luokkaan 2 kuuluvaa ärsyttävää ainetta. Olisi otettava huomioon, että syövyttämättömiä happoja, emäksiä, suoloja ja muita epäorgaanisia aineita ei sisällytetty validointiin. Tiettyjä tunnettuja orgaanisten ärsyttävien aineiden luokkia, kuten vetyperoksideja, fenoleita ja pinta-aktiivisia aineita ei myöskään sisällytetty validointiin tai ne sisällytettiin vain rajoitetusti.

1.5 PÄTEVYYDEN OSOITUS

Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tämän testimenetelmän mukaista validoitua menetelmää, ne voivat osoittaa teknisen pätevyytensä taulukossa 1 suositeltujen 10 aineen avulla. Tässä testimenetelmässä YK:n GHS:n vaihtoehtoista luokkaa 3 ei pidetä luokkana. Sellaisten tämän testimenetelmän mukaisesti kehitettyjen uusien ja samantyyppisten (me-too) testimenetelmien, jotka vastaavat rakenteellisesti ja toiminnallisesti validoituja vertailumenetelmiä tai muunnettuja validoituja menetelmiä, vertailukelpoinen luotettavuus ja tarkkuus olisi osoitettava tämän testimenetelmän liitteessä vahvistettujen suorituskykyvaatimusten mukaisesti ennen kuin niitä käytetään säännösten nojalla tehtäviin testeihin.

Taulukko 1

Pätevyyden osoittamisessa käytettävät aineet, jotka ovat myös liitteessä lueteltuja vertailuaineita

Aine	CAS-numero	*In vivo* -tulos	Fysikaalinen olomuoto	GHS-luokka
naftaleenietikkahappo	86-87-3	0	kiinteä	ei luokitusta
isopropanoli	67-63-0	0,3	neste	ei luokitusta
metyylistearaatti	112-61-8	1	kiinteä	ei luokitusta
heptyylibutyraatti	5870-93-9	1,7	neste	valinnainen luokka 3
heksyylisalisylaatti	6259-76-3	2	neste	valinnainen luokka 3
syklameenialdehydi	103-95-7	2,3	neste	luokka 2
1-bromiheksaani	111-25-1	2,7	neste	luokka 2
butyylimetakrylaatti	97-88-1	3	neste	luokka 2
1-metyyli-3-fenyyli-1-piperatsiini	5271-27-2	3,3	kiinteä	luokka 2
heptanaali	111-71-7	4	neste	luokka 2

1.6 MENETELMÄN KUVAUS

Seuraavassa esitellään rekonstruoitua ihmisorvaskesimallia käyttävän ihoärsyttävyystestin osat ja menettelyt. Rekonstruoitu ihmisorvaskesimalli voidaan valmistaa tai hankkia kaupallisesti (esim. EpiSkin™, EpiDerm™ ja SkinEthic RHE™). EpiSkin™-, EpiDerm™- ja SkinEthic RHE™- standarditestimenetelmät ovat verkkosivulla http://ecvam.jrc.ec.europa.eu (21, 22, 23). Testauksessa olisi noudatettava seuraavaa:

1.6.1 **Rekonstruoidun ihmisorvaskesimallin osat**

1.6.1.1 *Mallin yleiset ehdot*

Epiteelin valmistamiseen on käytettävä normaaleja ihmisen keratinosyyttejä. Toimivan marraskeden alla on oltava useita kerroksia eläviä epiteelisoluja (tyvisolukerros, okasolukerros ja jyväiskerros). Marraskedessä olisi oltava useita kerroksia ja tarvittava lipidiprofiili, jotta se voi tarjota toimivan esteen ja kykenee torjumaan solumyrkyllisten merkkiaineiden, kuten natriumdodekyylisulfaatin (SDS) tai Triton X-100:n, nopean läpäisyn. Läpäisyn estokykyä voidaan arvioida joko määrittämällä pitoisuus, jossa merkkiaine vähentää kudosten elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) vahvistetun altistusajan jälkeen, tai määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan solun elinkyvyn vähenemiseen 50 prosentilla (ET_{50}) applikoitaessa tietyn ja vahvistetun pitoista merkkiainetta. Mallin on oltava sellainen, että marraskeden ympärillä olevan materiaalin pääsy elävään kudokseen estyy, koska se heikentäisi mallin kykyä mallintaa ihoaltistusta. Ihomallissa ei saa olla kontaminaatiota (esim. bakteerit, virukset, mykoplasmat tai sieni-itiöt).

1.6.1.2 *Mallin toimintaa koskevat ehdot*

1.6.1.2.1 Solujen elinkyky

Elinkyvyn määrityksessä suositellaan käytettäväksi MTT:tä (20). Negatiivisella kontrollilla käsitellystä kudoksesta uutetun (liuotetun) väriaineen optisen tiheyden (OD) on oltava ainakin 20 kertaa suurempi kuin pelkän uuttamisliuottimen OD-arvo. Olisi dokumentoitava, että negatiivisella kontrollilla käsitellyn kudoksen on oltava stabiili viljelyssä (solujen elinkykyä koskevien mittaustulosten on oltava samanlaisia) koko testiin liittyvän altistusajan.

1.6.1.2.2 Läpäisyn esto

Marraskeden ja sen rasvakoostumuksen olisi oltava riittävä estämään solumyrkyllisten merkkiaineiden, kuten SDS:n tai Triton X-100:n nopea läpäisy, kuten on arvioitu IC_{50}:llä tai ET_{50}:llä.

1.6.1.2.3 Morfologia

Asianmukaisen pätevyyden omaavan henkilöstön olisi suoritettava rekonstruoidun ihon/orvaskeden histologinen tutkimus, jolla osoitetaan, että rekonstruktiolla on vastaava rakenne kuin ihmisiholla/ihmisorvaskedellä (myös monikerroksinen marraskesi).

1.6.1.2.4 Uusittavuus

Tiettyä mallia käyttävän menetelmän tulokset olisi voitava uusia ajan myötä mieluiten asianmukaisella erän kontrolliaineella (vertailuaineella) (ks. liite).

1.6.1.2.5 Mallin laatukontrollit

Kunkin orvaskesimallierän olisi täytettävä määritellyt tuotannon vapauttamisperusteet, joiden joukosta elinkykyisyyttä (kohta 1.6.2.1), ja läpäisyn estoa (kohta 1.6.1.2.2) koskevat perusteet ovat merkityksellisimmät. Ihomallin tuottajan (tai sisäistä mallia käytettäessä tarkastajan) olisi annettava IC_{50}:n tai ET_{50}:n hyväksyttävyyden vaihteluväli (ylempi ja alempi raja-arvo). Laboratorion olisi kudokset saatuaan todennettava niiden läpäisynestoominaisuudet. Ainoastaan hyväksytyillä kudoksilla saadut tulokset voidaan hyväksyä luotettavaksi ennusteeksi ärsytyksen vaikutuksista. Validoitujen vertailumenetelmien hyväksyttävyyden vaihteluvälit annetaan esimerkkinä jäljempänä.

Taulukko 2

Esimerkkejä laatukontrollin eränvapauttamisperusteista

	Alempi hyväksyttävyysraja	Hyväksyttävyyden keskiarvo	Ylempi hyväksyttävyysraja
Validoitu vertailumenetelmä 1 (18 tunnin käsittely SDS:llä	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 2,32 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
Validoitu vertailumenetelmä 2 (1 % Triton X100)	ET_{50} = 4,8 tuntia	ET_{50} = 6,7 tuntia	ET_{50} = 8,7 tuntia

1.6.1.3 *Testi- ja kontrolliaineen applikoiminen*

Kussakin käsittelyssä ja kontrollissa on käytettävä riittävä määrä kudosnäytteitä (vähintään kolme näytettä käsittelyä kohden). Sekä nestemäisiä että kiinteitä aineita käytettäessä olisi applikoitava riittävä määrä testiainetta tasaisesti ihon pinnalle kuitenkin niin, ettei käytetä rajoittamatonta annosta (ks. kohta 1.2 Määritelmät). Olisi siis käytettävä vähintään 25 $\mu L/cm^2$ tai 25 mg/cm^2. Kiinteitä aineita käytettäessä olisi orvaskeden pinta kostutettava ionisoimattomalla tai tislatulla vedellä ennen aineen applikointa, jotta ihoon saadaan hyvä kosketus. Kiinteät aineet olisi mahdollisuuksien mukaan testattava hienona jauheena. Altistuksen jälkeen testiaine pestään huolellisesti ihon pinnalta sopivalla vesiliukoisella puskuriliuoksella tai 0,9 % NaCl:lla. Rekonstruoidusta ihmisorvaskesimallista riippuen altistusaika voi olla 15–60 minuuttia ja inkubaatiolämpötila 20–37 °C. Yksityiskohtaiset tiedot ovat kolmea menetelmää koskevissa vakiomenettelyissä (21, 22 ja 23).

Kussakin tutkimuksessa olisi käytettävä rinnakkaisia negatiivisia ja positiivisia kontrolleja osoittamaan, että kudoksen elinkyky (negatiivinen kontrolli), läpäisyn esto ja kudoksen herkkyys testin jälkeen (positiivinen kontrolli) ovat määritellyn aikaisemman hyväksyttävyysvälin sisällä. Positiivisena kontrolliaineena suositellaan käytettäväksi 5 prosenttista vesiliukoista SDS:ää. Suositeltavat negatiiviset kontrollit ovat vesi tai fosfaattipuskuroitu suolaliuos (OSB).

1.6.1.4 *Solujen elinkykymittaukset*

Testimenettelyn tärkein osa on se, että elinkykymittauksia ei suoriteta heti testiaineille altistumisen jälkeen, vaan vasta, kun kudokset on käsittelyn jälkeen huuhdeltu ja kun ne ovat olleet riittävän pitkän inkubaatioajan tuoreessa elatusaineessa. Inkubaatioaika mahdollistaa palautumisen heikoista ihoärsytysvaikutuksista ja selkeiden sytotoksisten vaikutusten esilletulon. Testin optimointivaiheen aikana (9, 10, 11, 12 ja 13) on osoittautunut optimaaliseksi 42 tunnin käsittelyn jälkeinen inkubaatioaika, jota onkin näin ollen käytetty vertailutestimenetelmien validoinnissa.

MTT:n konversiotesti on määrällinen validoitu menetelmä, jota olisi käytettävä solun elinkyvyn mittaamiseen. Se on yhdenmukainen kolmiulotteisen kudosrakenteen käytön kanssa. Ihonäyte pannaan 3 tunniksi MTT-liuokseen, jonka pitoisuus on sopiva (esim. 0,3–1 mg/ml). Saostunut sininen formatsaani uutetaan kudoksesta liuottimella (esim. isopropanoli tai hapan isopropanoli), ja formatsaanipitoisuus määritetään mittaamalla OD-arvo 570 nm:ssä, ± 30 nm.

Testiaineen optiset ominaisuudet tai sen kemiallinen reaktio MTT:n kanssa voivat aiheuttaa sen, että testissä saadaan väärä arvio elinkyvystä (koska testiaine voi estää tai muuttaa värin muodostumisen tai vaihtoehtoisesti aiheuttaa sen). Näin voi tapahtua, jos erityistä testiainetta ei poisteta iholta kokonaisuudessaan huuhtelemalla, tai jos se imeytyy orvasketeen. Jos testiaine reagoi suoraan MTT:n kanssa, se on luonnostaan värillinen, tai jos se värjäytyy kudoksen käsittelyn aikana, on käytettävä lisäkontrolleja, jotta voidaan havaita ja korjata testiaineen vaikutus solujen elinkyvyn mittaukseen. Yksityiskohtainen kuvaus MTT:n suoran pelkistyksen testaamisesta on validoituja vertailumenetelmiä koskevassa testimenetelmässä (21, 22 ja 23). Näistä häiriöistä johtuva ei-spesifinen väri saa olla enintään 30 prosenttia negatiivisesta kontrollista (jolloin voidaan vielä tehdä korjauksia). Jos ei-spesifinen väri on > 30 %, testiaine on sopimaton testiin.

1.6.1.5 *Testin hyväksyttävyysperusteet*

Kussakin hyväksyttyjä eriä (ks. kohta 1.6.1.2.5) käyttävässä testissä olisi negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen kudosten OD:n oltava vastaava kuin kudoksilla, joille on suoritettu kaikki kuljetus- ja vastaanottovaiheet sekä ärsyttävyystestiprotokollat. Kontrollien OD-arvot eivät saisi olla alhaisemmat kuin vahvistetut aikaisemmat alemmat rajat. Vastaavasti positiivisella kontrollilla eli 5 prosenttisella vesiliukoisella SDS:llä, käsiteltyjen kudosten olisi ilmennettävä kudosten jäljellä olevaa herkkyyttä ja niiden kykyä reagoida ärsytystä aiheuttavaan aineeseen kussakin yksittäisessä testissä (esim. elinkyky ≤ 40 % validoidussa vertailumenetelmässä 1 ja ≤ 20 % validoidussa vertailumenetelmässä 2). Olisi määriteltävä tähän liittyvät ja asianmukaiset poikkeamat kudosnäytteiden välillä (esimerkiksi vakiopoikkeamien olisi oltava ≤ 18 %).

2. MITTAUSTULOKSET

2.1 MITTAUSTULOKSET

Kunkin testin osalta olisi esitettävä taulukkomuodossa yksittäisiä rinnakkaisia testinäytteitä koskevat mittaustulokset (esimerkiksi kunkin testiaineen OD-arvot ja solujen elinkyvyn laskettua prosentuaalista osuutta koskevat tiedot, mukaan luettuna luokittelu), ja tarvittaessa myös mittaustulokset toistetuista kokeista. Lisäksi olisi esitettävä kunkin kokeen keskiarvo ± keskihajonta. Kunkin testatun aineen osalta olisi esitettävä havaittu vuorovaikutus MTT-reagenssin ja värillisten testiaineiden kanssa.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Negatiivisen kontrollin OD-arvon katsotaan testissä edustavan 100-prosenttista solujen elinkykyä. Kullekin testinäytteelle saaduista OD-arvoista voidaan laskea solujen elinkyky prosentteina negatiivisesta kontrollista. Prosentuaalinen solujen elinkyvyn raja-arvo, jolla erotetaan ärsyttävät testiaineet luokittelemattomista testiaineista, ja tulosten arviointiin ja ärsyttävien aineiden tunnistamiseen käytettävät tilastomenetelmät, olisi määriteltävä selvästi ja dokumentoitava, ja niiden on osoitettava olevan soveltuvia. Validoituihin vertailumenetelmiin liittyvät ärsytyksen ennusteen raja-arvot on esitetty jäljempänä.

Testiaineen katsotaan aiheuttavan ihoärsytystä YK:n GHS-luokan 2 mukaisesti:

i) jos kudoksen elinkyky altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on alhaisempi tai yhtä suuri kuin (≤) 50 %.

Testiaineella ei katsota olevan luokitusta:

ii) jos kudoksen elinkyky altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on suurempi kuin (>) 50 %.

3. RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrolliaineet:

— kemiallinen nimi/kemialliset nimet, kuten IUPAC- tai CAS-nimi sekä CAS-numero, jos se tiedetään,

— aineen puhtaus ja koostumus (painoprosentteina),

— tutkimuksen suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (kuten fysikaalinen olomuoto, stabiilius ja haihtuvuus, pH ja vesiliukoisuus, jos se tiedetään),

— tarvittaessa testi- tai kontrolliaineiden käsittely ennen testiä (esim. lämmittäminen tai jauhaminen),

— varastointiolosuhteet.

Käytetyn ihomallin ja testisuunnitelman perustelut.

Testiolosuhteet:

— käytetty solujärjestelmä,

— solujen elinkykymäärityksessä käytetyn mittauslaitteen ja kaistanpäästösuotimen (esim. spektrofotometri) kalibrointiedot,

— täydelliset tiedot käytetyn spesifisen ihomallin tueksi (mm. mallin suorituskyky). Näitä voivat olla, luettelon olematta tyhjentävä:

  i) solujen elinkyky

  ii) läpäisyn esto

  iii) morfologia

  iv) uusittavuus ja ennustettavuus

  v) mallin laatukontrollit

— tiedot käytetystä testimenettelystä,

— testissä käytetyt annokset, altistuksen kesto ja käsittelyn jälkeinen inkubaatioaika,

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista,

— viittaukset mallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla, luettelon olematta tyhjentävä:

i) laatukontrollitietojen hyväksyttävyys verrattuna aikaisempia eriä koskeviin tietoihin;

ii) positiivisten ja negatiivisten kontrollien hyväksyttävyys verrattuna positiivisten ja negatiivisten kontrollien keskiarvoihin ja vaihteluväleihin,

— käytettyjen arviointitietojen kuvaus, mukaan luettuina ennustettavuusmallin raja-arvojen valinnan perusteet.

Tulokset:

— yksittäisistä testinäytteistä saadut tulokset taulukkomuodossa,

— kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

4. LÄHDELUETTELO

1. United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Saatavilla internetosoitteessa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html.

2. REACH: Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Saatavilla internetosoitteessa: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1232447649.

3. Testimenetelmä B.4. AKUUTTI TOKSISUUS: IHOÄRSYTTÄVYYS/-SYÖVYTTÄVYYS.

4. Testimenetelmä B.40. *IN VITRO* -IHOSYÖVYTTÄVYYS: IHON SÄHKÖVASTUSMÄÄRITYSTESTI (TER)

5. Testimenetelmä B.40a. *IN VITRO* -IHOSYÖVYTTÄVYYS: IHMISIHOMALLITESTI

6. OECD (2006). Test Guideline 435. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In Vitro* Membrane Barrier Test Method. Hyväksytty 19. heinäkuuta 2006. Saatavilla internetosoitteessa: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html.

7. ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Saatavilla kohdassa Download Study Documents verkkosivulla http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

8. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in Vitro* 15, s. 57–93.

9. Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. Toxicology *in Vitro* 16, s. 765–770.

10. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. ALTEX 21, s. 107–114.

11. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The EpiDerm Test Protocol fort the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test. ATLA 33, s. 351–367.

12. Cotovio, J., Grandidier, M.H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinsteen. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. ATLA 33, s. 329–249.

13. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A.(2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. ATLA 30, s. 109–129.

14. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotović, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, s. 559–601.

15. Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α. 135 s. + liitteet. Saatavilla kohdassa Download Study Documents verkkosivulla http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

16. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, s. 603–619.

17. J. Cotovio, M.–H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonneaud, J. Leclaire (2007). In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy -Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. Vol.14, s. 351–358.

18. ESAC statement on updated EpiDerm and similar SkinEthic assays. 5. marraskuuta 2008.

19. EC (2006). Kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta 18 päivänä joulukuuta 2006 annettu Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006. *Euroopan unionin virallinen lehti* L 396, s. 1, 30.12.2006. OPOCE, Luxembourg.

20. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, s. 55–63.

21. EpiSkin™ SOP, Version 1.6 (Tammikuu 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test – 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Saatavilla kohdassa Download Study Documents verkkosivulla http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

22. EpiDerm™ SOP, Version 5.0 (Lokakuu 2004). Draft Standard Operating Procedure. *In Vitro* Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. Saatavilla kohdassa Download Study Documents verkkosivulla http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

23. SkinEthic RHE™ SOP. Saatavilla kohdassa Download Study Documents verkkosivulla http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

24. Harvell, J.D., Lammintausta, K, Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. Practical Contact Dermatitis Mc Graw-Hill New York, s 7–18

25. Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for *in vitro* skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline. Ispra, 13. marraskuuta, 2008.

Lisäys

Ehdotetun rekonstruoitua ihmisorvaskesimallia käyttävän *in vitro* -ihoärsytystestin suorituskykyominaisuuksien arviointi

JOHDANTO

Tämän testimentelmän nojalla käytettäväksi ehdotettavat menettelyt olisi arvioitava niin luotettavuuden ja tarkkuuden määrittämiseksi käyttämällä aineita, jotka kuvastavat koko Draizen ihoärsytyksen pisteytysasteikkoa. Kun ehdotettu menettely arvioidaan käyttämällä 20 suositeltua vertailuainetta (taulukko 2), sen luotettavuus- ja tarkkuusarvojen olisi oltava vastaavat kuin validoidulla vertailumenetelmällä 1 (taulukko 3) saadut arvot (1). Jäljempänä II ja III kohdassa annetaan tarkkuus- ja luotettavuusarvot, jotka olisi saavutettava. Näihin on sisällytetty asiaan vaikuttaviin kemiallisiin luokkiin kuuluvat luokittelemattomat ja luokitellut (YK:n GHS-luokka 2) aineet, jotta ehdotetun testimenetelmän luotettavuus- ja suorituskykyarvoja (herkkyys, spesifisyys, väärät negatiiviset ja positiiviset arvot sekä tarkkuus) voidaan verrata validoidulla vertailumenetelmä 1:llä saatuihin arvoihin. Testimentelmän luotettavuus sekä sen kyky tunnistaa oikein YK:n GHS-luokkaan 2 kuuluvat ärsytystä aiheuttavat aineet olisi määritettävä ennen se käyttämistä uusien aineiden testaamiseen.

SUORITUSVAATIMUKSET

Suoritusvaatimuksiin kuuluu kolme seuraavaa osatekijää: I) Testimenetelmän oleelliset osat, II) Vertailuaineet ja III) Määritellyt tarkkuus- ja luotettavuusarvot (2). Nämä suoritusvaatimukset perustuvat ECVAMin ihoärsytystä validointitutkimuksen suorittamisen jälkeen määriteltyihin suoritusvaatimuksiin (3).

I) **Testimenetelmän oleelliset osat**

Mallin yleiset ehdot

Epiteelin valmistamiseen on käytettävä normaaleja ihmisen keratinosyyttejä. Toimivan marraskeden alla on oltava useita kerroksia eläviä epiteelisoluja (tyvisolukerros, okasolukerros ja jyväiskerros). Marraskedessä olisi oltava useita kerroksia ja tarvittava lipidiprofiili, jotta se voi tarjota toimivan esteen ja kykenee torjumaan solumyrkyllisten merkkiaineiden, kuten SDS:n tai Triton X-100:n, nopean läpäisyn. Läpäisyn estokykyä voidaan arvioida joko määrittämällä pitoisuus, jossa merkkiaine vähentää kudosten elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) vahvistetun altistusajan jälkeen, tai määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan solun elinkyvyn vähenemiseen 50 prosentilla (ET_{50}) applikoitaessa tietyn ja vahvistetun pitoista merkkiainetta. Mallin on oltava sellainen, että marraskeden ympärillä olevan materiaalin pääsy elävään kudokseen estyy, koska se heikentäisi mallin kykyä mallintaa ihoaltistusta. Ihomallissa ei saa olla kontaminaatiota (esim. bakteerit, virukset, mykoplasmat tai sieni-itiöt).

Mallin toimintaa koskevat ehdot

Solujen elinkyky

Elinkyvyn määrityksessä suositellaan käytettäväksi MTT:tä (4). Negatiivisella kontrollilla käsitellystä kudoksesta uutetun (liuotetun) väriaineen optisen tiheyden (OD) on oltava ainakin 20 kertaa suurempi kuin uuttamisliuottimen OD-arvo. Olisi dokumentoitava, että negatiivisella kontrollilla käsitellyn kudoksen on oltava stabiili viljelyssä (solujen elinkykyä koskevien mittaustulosten on oltava samanlaisia) koko testiin liittyvän altistusajan.

Läpäisyn esto

Marraskeden ja sen rasvakoostumuksen olisi oltava riittävä estämään solumyrkyllisten merkkiaineiden, kuten SDS:n tai Triton X-100:n nopea läpäisy, kuten on arvioitu IC_{50}:llä tai ET_{50}:llä.

Morfologia

Asianmukaisen pätevyyden omaavan henkilöstön olisi suoritettava rekonstruoidun ihon/orvaskeden histologinen tutkimus, jolla osoitetaan, että rekonstruktiolla on vastaava rakenne kuin ihmisiholla/ihmisorvaskedellä (myös monikerroksinen marraskesi).

Uusittavuus

Tiettyä mallia käyttävän menetelmän tulokset olisi voitava uusia ajan myötä mieluiten asianmukaisella erän kontrolliaineella (vertailuaineella) (ks. määritelmät kohdassa 1.2).

Mallin laatukontrollit

Kunkin orvaskesimallierän olisi täytettävä määritellyt tuotannon vapauttamisperusteet, joiden joukosta *elinkykyisyyttä* ja *läpäisyn estoa* koskevat perusteet ovat merkityksellisimmät. Ihomallin tuottajan (tai sisäistä mallia käytettäessä tarkastajan) olisi annettava IC_{50}:n tai ET_{50}:n hyväksyttävyyden vaihteluväli (ylempi ja alempi raja-arvo). Laboratorion olisi kudokset saatuaan todennettava niiden läpäisynesto-ominaisuudet. Ainoastaan hyväksytyillä kudoksilla saadut tulokset voidaan hyväksyä luotettavaksi ennusteeksi ärsytyksen vaikutuksista. Validoitujen vertailumenetelmien hyväksyttävyyden vaihteluvälit annetaan esimerkkinä jäljempänä.

Taulukko 1

Esimerkkejä laatukontrollin eränvapauttamisperusteista

	Alempi hyväksyttävyysraja	Hyväksyttävyyden keskiarvo	Ylempi hyväksyttävyysraja
Validoitu vertailumenetelmä 1 (18 tunnin käsittely SDS:llä)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 2,32 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
Validoitu vertailumenetelmä 2 (1 % Triton X100)	ET_{50} = 4,8 tuntia	ET_{50} = 6,7 tuntia	ET_{50} = 8,7 tuntia

II) **Vertailuaineet**

Vertailuaineita käytetään määrittämään, onko ehdotetun uuden rekonstruoitua ihmisorvaskettä käyttävän *in vitro* -testimenetelmän, jonka luotettavuuden ja tarkkuuden on osoitettu olevan rakenteellisesti ja toiminnallisesti riittävässä määrin validoituja vertailumenetelmiä vastaava, tai validoidun vertailumenetelmän vähäistä muutosta edustava suorituskyky vastaava kuin validoidun vertailumenetelmän 1 (1). Taulukossa 20 lueteltuihin vertailuaineisiin kuuluu muihin asiaa koskeviin kemiallisiin luokkiin sekä YK:n GHS-luokkaan 2 kuuluvia aineita. Tässä luettelossa on 10 YK:n GHS-luokkaan 2 kuuluvaa ainetta, 3 YK:n GHS:n vaihtoehtoiseen luokkaan 3 kuuluvaa ainetta ja 7 luokittelematonta ainetta. Tässä testimenetelmässä YK:n GHS:n vaihtoehtoista luokkaa 3 ei pidetä luokkana. Vertailuaineet ovat niiden aineiden vähimmäismäärä, joita olisi käytettävä arvioitaessa ehdotetun rekonstruoitua ihmisorvaskettä käyttävän testimenetelmän tarkkuutta ja luotettavuutta ihoärsytyksen havaitsemisessa. Jos lueteltuja aineita ei ole saatavissa, olisi käytettävä muita aineita, joista on riittävästi *in vivo* -vertailutietoja. Vertailuaineiden vähimmäisluetteloon voidaan haluttaessa lisätä muihin kemiallisiin luokkiin kuuluvia aineita, joista on riittävästi *in vivo* -vertailutietoja ehdotetun testimenetelmän tarkkuuden lisäarviointeja varten.

Taulukko 2

Rekonstruoitua ihmisorvaskesimallia käyttävien ihoärsytystestien tarkkuus- ja luotettavuusrajojen määrittämisessä käytettävät vertailuaineet

Aine (*)	CAS-nro	EINECS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -tulos	GHS- *in vitro* -luokitus	GHS- *in vivo* -luokitus
1-bromi-4-klooributaani	6940-78-9	230-089-3	neste	0	luokka 2	ei luokitusta
dietyyliftalaatti	84-66-2	201-550-6	neste	0	ei luokitusta	ei luokitusta
naftaleenietikkahappo	86-87-3	201-705-8	kiinteä	0	ei luokitusta	ei luokitusta
allyylifenoksiasetaatti	7493-74-5	231-335-2	neste	0,3	ei luokitusta	ei luokitusta
isopropanoli	67-63-0	200-661-7	neste	0,3	ei luokitusta	ei luokitusta
4-(metyylitio)-bentsaldehydi	3446-89-7	222-365-7	neste	1	luokka 2	ei luokitusta
metyylistearaatti	112-61-8	203-990-4	kiinteä	1	ei luokitusta	ei luokitusta

Aine (*)	CAS-nro	EINECS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -tulos	GHS- *in vitro* -luokitus	GHS- *in vivo* -luokitus
heptyylibutyraatti	5870-93-9	227-526-5	neste	1,7	ei luokitusta	Valinnainen luokka 3
heksyylisalisylaatti	6259-76-3	228-408-6	neste	2	ei luokitusta	Valinnainen luokka 3
tri-isobutyylifosfaatti	126-71-6	204-798-3	neste	2	luokka 2	Valinnainen luokka 3
1-dekanoli	112-30-1	203-956-9	neste	2,3	luokka 2	luokka 2
syklameenialdehydi	103-95-7	203-161-7	neste	2,3	luokka 2	luokka 2
1-bromiheksaani	111-25-1	203-850-2	neste	2,7	luokka 2	luokka 2
2-kloorimetyyli-2,5-dimetyyli-4-metoksipyridiini-hydrokloridi	86604-75-3	434-680-9	kiinteä	2,7	luokka 2	luokka 2
a-terpineoli	98-55-5	202-680-6	neste	2,7	luokka 2	luokka 2
di-n-propyylidisulfidi	629-19-6	211-079-8	neste	3	ei luokitusta	luokka 2
butyylimetakrylaatti	97-88-1	202-615-1	neste	3	luokka 2	luokka 2
bentseenitioli, 5-(1,1-dimetyylietyyli)-2-metyyli	7340-90-1	438-520-9	neste	3,3	luokka 2	luokka 2
1-metyyli-3-fenyyli-1-piperatsiini	5271-27-2	431-180-2	kiinteä	3,3	luokka 2	luokka 2
heptanaali	111-71-7	203-898-4	neste	4	luokka 2	luokka 2

(*) Nämä 20 vertailuainetta ovat edustava otos niistä 58 aineesta, joita käytettiin alun perin vertailumenetelmän 1 (EpiSkin™) validoinnissa. Täydellinen luettelo testiaineista ja niiden valinnassa käytetyistä perusteista on saatavilla (5).

Taulukossa 2 luetellut aineet ovat edustava otos niistä 58 aineesta, joita käytettiin ECVAMin kansainvälisessä ihoärsytyksen validointitutkimuksessa (1). Ne valittiin seuraavilla perusteilla:

— aineet ovat kaupallisesti saatavilla,

— ne edustavat koko Draizen ärsyttävyyspisteytysasteikkoa (ärsyttämättömästä erittäin ärsyttävään),

— niiden kemiallinen rakenne on tarkkaan määritetty,

— niillä tehdyt testit ovat uusittavissa ja ennustettavissa, validoidun menetelmän tapaan, ECVAMin validointitutkimuksen mukaisesti,

— niiden kemiallinen toimivuus on sama kuin validointiprosessissa käytettyjen kemikaalien,

— niillä ei ole erittäin toksisia ominaisuuksia (esim. karsinogeenisiä tai lisääntymisjärjestelmälle myrkyllisiä ominaisuuksia) eivätkä niiden loppukäsittelykustannukset saa olla niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön.

III) **Määritellyt tarkkuus- ja luotettavuusarvot**

Ehdotetun testimenetelmän suorituskyvyn (herkkyys, spesifisyys, väärät negatiiviset tai positiiviset arvot ja tarkkuus) pitäisi olla vastaavat kuin vertailumenetelmän 1 (taulukko 3) arvot, eli herkkyyden olisi oltava yhtä suuri tai suurempi kuin (≥) 80 % ja spesifisyys olisi oltava yhtä suuri tai suurempi (≥) kuin 70 %, ja tarkkuuden olisi oltava yhtä suuri tai suurempi (≥) kuin 75 %. Suorituskyvyn laskemisessa olisi käytettävä kaikkia 20 aineen luokituksia, jotka on saatu osallistuvissa laboratorioissa tehdyissä testeissä. Kaikki aineet olisi luokiteltava kussakin laboratoriossa eri testikerroilla (vähintään kolme testikertaa) saatujen elinkykyä osoittavien arvojen keskiarvojen mukaisesti.

Taulukko 3

Validoidun vertailumenetelmän 1 ([1]) suorituskyky

Testimenetelmä	Aineiden lukumäärä	Herkkyys	Spesifisyys	Väärien negatiivisten tulosten osuus	Väärien positiivisten tulosten osuus	Tarkkuus
Validoitu vertailumenetelmä 1 ([1])	58	87,2 % ([2])	71,1 % ([3])	12,8 %	29,9 %	74,7 %
Validoitu vertailumenetelmä 1 ([1])	20	90 %	73,3 %	10 %	26,7 %	81,7 %

([1]) EpiSkin™
([2]) Validointiin kuuluu 13 GHS-luokkaan 2 kuuluvaa ärsyttävää ainetta.
([3]) Validointiin kuuluu 45 GHS-luokkaan 3 kuuluvaa ärsyttävää ainetta tai ainetta, joilla ei ole GHS-luokitusta.

Ehdotetun testimenetelmän luotettavuuden pitäisi olla vastaava kuin validoidun vertailumenetelmän luotettavuus.

Laboratorionsisäinen uusittavuus

Laboratorionsisäisen vaihtelun arvioinnin olisi osoitettava, että yhdessä laboratoriossa 20 vertailuaineella suoritetuilla yksittäisillä ja erillisillä testikierroksilla saatujen luokitusten (luokka 2 tai ei luokitusta) vastaavuus on yhtä suuri tai suurempi kuin (≥) 90 %.

Laboratorioiden välinen uusittavuus

Laboratorioiden välinen uusittavuus ei ole oleellista, jos ehdotettua testimenetelmää käytetään vain yhdessä laboratoriossa. Jotta menetelmiä voitaisiin siirtää laboratorioiden välillä, olisi mieluiten kolmen eri laboratorion välillä 20 vertailuaineella suoritetuilla yksittäisillä ja erillisillä testikierroksilla saatujen luokitusten (luokka 2 tai ei luokitusta) vastaavuus oltava yhtä suuri tai suurempi kuin (≥) 80 %.

LÄHDELUETTELO

1. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotović, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, s. 559–601.

2. OECD (2005) Guidance Document No. 34 on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD, Paris.

3. ECVAM (2007) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Saatavilla kohdassa Download Study Documents verkkosivulla http://ecvam.jrc.ec.europa.eu. Linkkiä kokeiltu 27.10.2008.

4. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, s. 55–63.

5. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, s. 603–619.

([1]) Taulukossa 3 annetaan validoidun referenssimenetelmän 1 suorituskyky, eli arvio siitä, missä määrin menetelmällä pystytään tunnistamaan oikein ärsytystä aiheuttavat aineet (YK:n GHS-luokka 2) 58 vertailuaineen joukosta ja luokittelemattomat aineet (ei luokitusta ja vaihtoehtoinen luokka 3) 20 vertailuaineen joukosta (taulukko 2).

LIITE IV

C.3. **MAKEAN VEDEN LEVIEN JA SYANOBAKTEERIEN KASVUNESTYMISTESTI**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 201, 2006 (1).

1.1 JOHDANTO

Testimenetelmiä tarkistetaan ja päivitetään säännöllisesti tieteen kehityksen perusteella. Testimenetelmää C.2 oli tarkistettava, jotta siihen olisi voitu lisätä uusia lajeja ja jotta olisi voitu täyttää vaaranarviointia ja kemikaalien luokitusta koskevat vaatimukset. Tarkistus perustuu laajaan käytännön kokemukseen, tieteen kehitykseen leviin kohdistuvien myrkyllisyystutkimusten alalla sekä testimenetelmän aiemman version laajaan käyttöön sääntelyssä.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä ja lyhenteitä:

Biomassa: Populaatiossa olevan elävän materiaalin kuivapaino ilmaistuna tiettyä tilavuutta kohden, esimerkiksi milligrammoina levää yhtä litraa testiliuosta kohden. Yleensä ”biomassa” määritellään massaksi, mutta tässä testissä sillä tarkoitetaan massaa tilavuutta kohden. Tässä testissä biomassaa mitataan usein myös epäsuorasti esimerkiksi solumäärien ja fluoresenssin avulla, minkä vuoksi ”biomassa”-termi käsittää myös nämä korvaavat menetelmät.

Variaatiokerroin: Parametrin vaihtelua ilmaiseva dimensioton suure, joka määritellään keskihajonnan ja keskiarvon suhteeksi. Se voidaan ilmaista myös prosenttiarvona. Rinnakkaisten kontrolliviljelmien keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden keskimääräinen variaatiokerroin lasketaan seuraavasti:

1. Keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden variaatiokerroin lasketaan (prosentteina) kunkin rinnakkaisviljelmän päivittäisistä tai jaksoittaisista kasvunopeuksista.

2. Lasketaan kaikkien kohdassa 1 laskettujen arvojen keskiarvo, jotta saadaan rinnakkaisten kontrolliviljelmien päivittäisen tai jaksoittaisen spesifisen kasvunopeuden keskimääräinen variaatiokerroin.

ECx: Testiviljelyaineeseen liuenneen testiaineen pitoisuus, jossa testattavan eliön kasvu vähenee x prosenttia (esimerkiksi 50 prosenttia) määrätyn altistusajan kuluessa (altistusaika on mainittava erikseen, jos se poikkeaa testin kokonaiskestosta tai normaalista kestosta). Jotta kasvunopeudesta ja tuotoksesta johdetut EC-arvot erottuisivat selvästi toisistaan, edellisestä käytetään symbolia ”E_rC” ja jälkimmäisestä symbolia ”E_yC”.

Viljelyaine: Täydellinen synteettinen ravinneliuos, jossa testilevät kasvavat, kun ne altistetaan testiaineelle. Yleensä testiaine on liuennut testiviljelyaineeseen.

Kasvunopeus (**keskimääräinen spesifinen kasvunopeus**): Biomassan logaritminen kasvu altistuksen aikana.

Pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC): Pienin testattu pitoisuus, jossa aineella havaitaan olevan tietyn altistusajan kuluessa tilastollisesti merkittävä kasvua vähentävä vaikutus verrattuna kontrolliin (kun $p < 0,05$). Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC): Lähin LOEC-pitoisuutta pienempi testipitoisuus.

Vastemuuttuja: Muuttuja, jonka avulla arvioidaan myrkyllisyyttä. Vastemuuttuja johdetaan erilaisia laskentamenetelmiä käyttämällä mistä tahansa mitatusta muuttujasta, joka kuvaa biomassaa. Tässä menetelmässä kasvunopeudet ja tuotos ovat vastemuuttujia, jotka on johdettu mittaamalla biomassaa suoraan tai käyttämällä edellä mainittuja korvaavia menetelmiä.

Spesifinen kasvunopeus: Vastemuuttuja, joka määritellään havainnoitavan parametrin (tässä testimenetelmässä biomassan) luonnollisten logaritmien erotuksen ja vastaavan ajanjakson väliseksi suhteeksi.

Tuotos: Altistusajan lopussa mitattu biomassaa ilmaisevan mittausmuuttujan arvo, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu saman mittausmuuttujan arvo.

1.3 TESTIN SOVELTAMISALA

Tätä testimenetelmää voidaan parhaiten soveltaa vesiliukoisiin aineisiin, jotka todennäköisesti pysyvät veteen liuenneina testiolosuhteissa. Testattaessa aineita, jotka ovat haihtuvia, voimakkaasti adsorboivia, värillisiä tai huonosti veteen liukenevia, tai aineita, jotka voivat vaikuttaa testiviljelyaineessa olevien ravinteiden tai kivennäisaineiden saantiin, voi olla tarpeen tehdä tiettyjä mukautuksia tässä kuvattuun menetelmään (esimerkiksi suljettu järjestelmä ja koeastioiden erityisvalmistelu). Kirjallisuusviitteissä (2), (3) ja (4) annetaan ohjeita joistakin sopivista mukautuksista.

1.4 TESTIN PERIAATE

Testin tavoitteena on määrittää testattavan aineen vaikutukset makean veden viherlevien ja/tai syanobakteereiden kasvuun. Eksponentiaalisesti kasvavat koe-eliöt altistetaan testiaineelle panosviljelmissä yleensä 72 tunnin ajan. Vaikka testi on suhteellisen lyhyt, sillä voidaan arvioida useaan sukupolveen kohdistuvia vaikutuksia.

Järjestelmän vasteena on kasvun väheneminen sarjassa leväviljelmiä (testiyksiköitä), jotka on altistettu testiaineen eri pitoisuuksille. Vastetta arvioidaan altistuspitoisuuden funktiona vertaamalla sitä rinnakkaisten, altistumattomien kontrolliviljelmien keskimääräiseen kasvuun. Jotta järjestelmän vaste myrkkyvaikutuksiin ilmenisi kokonaan (optimaalinen herkkyys), viljelmien kasvua ei rajoiteta vaan niiden annetaan kasvaa eksponentiaalisesti olosuhteissa, joissa on riittävästi ravinteita ja valonsaanti on jatkuvaa, kunnes spesifisen kasvunopeuden pieneneminen on mitattavissa.

Kasvua ja kasvun estymistä kvantifioidaan mittaamalla leväbiomassa ajan funktiona. Leväbiomassa määritetään kuivapainona tilavuutta kohden, esimerkiksi milligrammoina levää yhtä litraa testiliuosta kohden. Kuivapainoa on kuitenkin vaikea mitata, minkä vuoksi käytetään korvaavia parametreja. Useimmin käytettyjä ovat solumäärät. Muita korvaavia parametreja ovat muun muassa solutilavuus, fluoresenssi ja optinen tiheys. Mitatun korvaavan parametrin ja biomassan välinen muuntokerroin on tunnettava.

Testin loppupisteenä on kasvun estyminen, joka ilmenee biomassan logaritmisesta kasvusta (keskimääräisestä spesifisestä kasvunopeudesta) altistusaikana. Testiliuossarjassa mitattujen keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien avulla määritetään pitoisuus, jossa kasvunopeus vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_rC_x-arvona (esimerkiksi E_rC_{50}).

Käytettäessä tätä menetelmää EU:n sääntelykehyksessä pitäisi tulokset laskea keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien perusteella jäljempänä 2.2 kohdassa selostetuista syistä. Toinen testimenetelmässä käytetty vastemuuttuja on tuotos, jota voidaan tarvita joissakin maissa erityisten sääntelyvaatimusten täyttämiseksi. Tuotoksella tarkoitetaan altistusajan lopussa mitatun biomassan ja altistusajan alussa mitatun biomassan erotusta. Testiliuossarjassa mitatun tuotoksen avulla määritetään pitoisuus, jossa tuotos vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_yC_x-arvona (esimerkiksi E_yC_{50}).

Tilastollisesti voidaan määrittää myös pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) sekä pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC).

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Testiainetta koskevia tietoja, joista voi olla hyötyä päätettäessä testiolosuhteista, ovat rakennekaava, puhtaus, stabiilius valossa, stabiilius testiolosuhteissa, valonabsorbointiominaisuudet, pK_a ja muuntumistutkimusten tulokset, mukaan luettuna biohajoavuus vedessä.

Testiaineen vesiliukoisuus, oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin (P_{ow}) ja höyrynpaine on tunnettava, ja testiliuoksissa olevan testiaineen kvantifioimiseen tarvitaan validoitu menetelmä, jonka saantoteho ja havaitsemisraja tunnetaan.

1.6 VERTAILUAINE

Testimenetelmä voidaan tarkistaa testaamalla vertailuaine (-aineet), kuten 3,5-dikloorifenoli, jota on käytetty kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (4). Viherleviä viljeltäessä vertailuaineena voidaan käyttää myös kaliumdikromaattia. Vertailuaine olisi hyvä testata vähintään kahdesti vuodessa.

1.7 TESTIN VALIDITEETTI

Jotta testi olisi validi, sen on täytettävä seuraavat vaatimukset:

— Biomassan on täytynyt kasvaa kontrolliviljelmissä eksponentiaalisesti vähintään 16-kertaiseksi 72 tunnin testijakson aikana. Tämä vastaa spesifistä kasvunopeutta 0,92 päivää kohden. Useimmin käytetyillä lajeilla kasvunopeus on yleensä huomattavasti suurempi (ks. lisäys 1). Tämä vaatimus ei välttämättä täyty käytettäessä lajeja, jotka kasvavat hitaammin kuin lisäyksessä 1 luetellut lajit. Siinä tapauksessa testijaksoa on pidennettävä, jotta kontrolliviljelmissä saavutettaisiin vähintään 16-kertainen kasvu, ja kasvun on oltava eksponentiaalista koko testijakson ajan. Testijaksoa voidaan lyhentää 48 tuntiin saakka rajoittamattoman eksponentiaalisen kasvun ylläpitämiseksi koko testin ajan, jos kasvukerroin on vähintään 16.

— Kontrolliviljelmien jaksoittaisten spesifisten kasvunopeuksien (72 tunnin testeissä päivät 0–1, 1–2 ja 2–3) keskimääräinen variaatiokerroin (ks. ”Variaatiokerroin” kohdassa 1.2) saa olla enintään 35 prosenttia. Jaksoittaisen spesifisen kasvunopeuden laskemista käsitellään jäljempänä kohdassa 2.2.1. Tämä vaatimus koskee rinnakkaisia kontrolliviljelmiä varten laskettujen variaatiokertoimien keskiarvoa.

— Rinnakkaisten kontrolliviljelmien keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien variaatiokerroin saa olla koko testijakson aikana enintään 7 prosenttia, jos testeissä käytetään lajeja *Pseudokirchneriella subcapitata* ja *Desmodesmus subspicatus*. Käytettäessä muita, harvemmin testattuja lajeja tämä arvo saa olla enintään 10 prosenttia.

1.8 MENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Välineet**

Koeastioiden ja muiden välineiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Ne on pestävä huolellisesti, jotta mitkään orgaaniset tai epäorgaaniset epäpuhtaudet eivät vaikuttaisi leväkasvuun tai testiliuosten koostumukseen.

Koeastiat ovat yleensä lasipulloja, jotka ovat niin suuria, että viljelmän tilavuus riittää testin aikaisiin mittauksiin ja CO_2:n siirtyminen ilmakehästä on riittävää (ks. kohdan 1.8.9 toinen kappale). Nestetilavuuden täytyy olla riittävän suuri analyyttisiä määrityksiä varten (ks. kohdan 1.8.11 viides kappale).

Lisäksi tarvitaan seuraavia välineitä (kaikkia tai joitakin niistä):

— Viljelylaite: Suosituksena on käyttää kaappia tai kammiota, jossa valittua inkubointilämpötilaa voidaan pitää yllä ± 2 °C:n tarkkuudella.

— Valonmittauslaitteet: On tärkeää muistaa, että valon voimakkuuden mittausmenetelmä ja erityisesti mittausanturin (keräimen) tyyppi vaikuttavat mitattuun arvoon. Mittauksissa olisi mieluimmin käytettävä pyöreää (4 π) mittausanturia (joka reagoi suoraan valoon ja heijastuneeseen valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason ylä- ja alapuolelta) tai 2 π:n mittausanturia (joka reagoi valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason yläpuolelta).

— Leväbiomassan määrityslaite: Solumäärä, joka on yleisin leväbiomassan sijasta käytetty parametri, voidaan laskea käyttämällä elektronista hiukkaslaskinta, laskukammiolla varustettua mikroskooppia tai virtaussytometria. Muita biomassan sijasta käytettyjä parametreja voidaan mitata virtaussytometrilla, fluorimetrilla, spektrofotometrilla tai kolorimetrilla. On hyödyllistä laskea solumäärän ja kuivapainon välinen muuntokerroin. Jotta mittaukset onnistuisivat spektrofotometrilla pienissä biomassapitoisuuksissa, voi olla tarpeen käyttää kyvettejä, joissa valotien pituus on vähintään 4 cm.

1.8.2 **Koe-eliöt**

Testissä voidaan käyttää monia kiinnittymättömiä mikrolevä- ja syanobakteerilajeja. Lisäyksessä 1 lueteltujen kantojen on todettu soveltuvan tähän testimenetelmään.

Jos testissä käytetään muita lajeja, niiden kanta ja/tai alkuperä on ilmoitettava. Lisäksi on varmistettava, että testiin valitun levän eksponentiaalista kasvua voidaan pitää yllä testiolosuhteissa koko testijakson ajan.

1.8.3 **Viljelyaine**

Testiä varten suositetaan kahta vaihtoehtoista viljelyainetta: OECD- ja AAP-viljelyainetta. Niiden koostumus esitetään lisäyksessä 2. On syytä huomata, että näiden kahden viljelyaineen alkuperäinen pH-arvo ja puskurikapasiteetti (joka säätelee pH:n kasvua) ovat erilaisia, minkä vuoksi ne voivat antaa erilaisia tuloksia varsinkin, kun testataan ionisoivia aineita.

Viljelyaineita voidaan joutua mukauttamaan esimerkiksi silloin, kun testataan metalleja ja kelatoivia aineita tai kun testaus suoritetaan erilaisilla pH-arvoilla. Mukautetun viljelyaineen käyttö on perusteltava ja kuvattava yksityiskohtaisesti (3)(4).

1.8.4 **Biomassan alkupitoisuus**

Biomassan alkupitoisuuden on oltava sama kaikissa testiviljelmissä ja niin pieni, että kasvu on eksponentiaalista koko inkubointiajan ilman, että ravinteet uhkaavat loppua. Biomassan alkupitoisuus saa olla enintään 0,5 mg/l kuivapainona ilmaistuna. Suosituksena on käyttää seuraavia solujen alkupitoisuuksia:

Pseudokirchneriella subcapitata	5×10^3–10^4	solua/ml
Desmodesmus subspicatus	2–5×10^3	solua/ml
Navicula pelliculosa	10^4	solua/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	solua/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4–10^5	solua/ml

1.8.5 **Testiaineen pitoisuudet**

Pitoisuusalue, jolla vaikutuksia todennäköisesti esiintyy, voidaan määrittää alueenmäärityskokeiden avulla. Varsinaista testiä varten on valittava vähintään viisi pitoisuutta, jotka muodostavat geometrisen sarjan, jonka suhdeluku on enintään 3,2. Suurempikin suhdeluku voi olla aiheellinen, jos testiaineella saadaan laakea pitoisuus-vastekäyrä. Pitoisuussarjan tulisi käsittää pitoisuusalue, jolla levän kasvunopeus hidastuu 5–75 prosenttia.

1.8.6 **Toistot ja kontrollit**

Testiin on kuuluttava kolme toistoa kutakin pitoisuutta kohden. Jos NOEC-pitoisuutta ei tarvitse määrittää, koejärjestelyä voidaan muuttaa lisäämällä pitoisuuksien määrää ja vähentämällä toistojen määrää pitoisuutta kohden. Kontrollitoistoja on oltava vähintään kolme, ja niitä on mieluimmin tehtävä kaksi kertaa enemmän kuin kutakin testipitoisuutta kohden tehtyjä toistoja.

Testiaineen pitoisuuksien analyyttisiä määrityksiä varten voidaan valmistaa erillinen testiliuossarja (ks. kohdan 1.8.11 neljäs ja kuudes kappale).

Jos testiaine on liuotettava liuottimella, koejärjestelyyn on kuuluttava ylimääräisiä kontrolliviljelmiä, jotka sisältävät liuotinta samana pitoisuutena kuin testiviljelmät.

1.8.7 **Inokulaattiviljelmän valmistaminen**

Jotta testissä käytettävät levät sopeutuisivat testiolosuhteisiin ja olisivat eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, kun ne siirrostetaan testiliuoksiin, testiviljelyaineeseen valmistetaan 2–4 päivää ennen testin alkua inokulaattiviljelmä. Leväbiomassaa on säädeltävä siten, että eksponentiaalinen kasvu jatkuu inokulaattiviljelmässä testin alkuun saakka. Inokulaattiviljelmää inkuboidaan samoissa olosuhteissa kuin testiviljelmiä. Biomassan kasvu inokulaattiviljelmässä mitataan sen varmistamiseksi, että kasvu vastaa testissä käytettävän kannan normaalia kasvua viljelyolosuhteissa. Lisäyksessä 3 annetaan yksi esimerkki levänviljelymenetelmistä. Inokulaattiviljelmässä voidaan joutua käynnistämään toinen lisäysvaihe, jotta testin aikana ei tapahtuisi synkronista solunjakautumista.

1.8.8 **Testiliuosten valmistaminen**

Viljelyaineen pitoisuuden ja testilevien biomassan alkupitoisuuden on oltava samat kaikissa testiliuoksissa. Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan yleensä sekoittamalla testiaineen kantaliuos viljelyaineen ja inokulaattiviljelmän kanssa. Kantaliuokset valmistetaan yleensä liuottamalla testattava aine testiviljelyaineeseen.

Liuottimia, kuten asetonia, t-butyylialkoholia ja dimetyyliformamidia, voidaan käyttää kantoaineina, kun testiviljelyaineeseen lisätään huonosti veteen liukenevia aineita (2)(3). Liuottimen pitoisuus saa olla enintään 100 µl/l, ja kaikkiin testisarjan viljelmiin (kontrolliviljelmät mukaan luettuina) on lisättävä samanpitoista liuotinta.

1.8.9 **Inkubointi**

Koeastiat suljetaan ilmaa läpäisevillä tulpilla. Astioita ravistellaan ja ne asetetaan viljelylaitteeseen. Niitä on ravisteltava ja sekoitettava koko testin ajan, jotta levät pysyisivät suspendoituneina ja CO_2:n siirtyminen liuoksiin helpottuisi. Viljelmien lämpötila pidetään alueella 21–24 °C (säätötarkkuus ± 2 °C). Käytettäessä muita kuin lisäyksessä 1 lueteltuja lajeja, kuten trooppisia lajeja, lämpötila voi olla korkeampikin, kunhan validiteettivaatimukset täyttyvät. Suositeltavaa on sijoittaa pullot satunnaiseen järjestykseen ja vaihtaa niiden paikkaa inkubaattorissa päivittäin.

Yleensä kontrolliviljelyaineen pH-arvo saa vaihdella kokeen aikana enintään 1,5 yksikköä. Kun on kyse metalleista ja yhdisteistä, jotka ionisoituvat osittain jotakuinkin samassa pH:ssa kuin testissä, pH-muutoksia voidaan joutua rajoittamaan tarkkojen ja toistettavien tulosten saamiseksi. Muutokset voidaan rajoittaa teknisesti alle 0,5 yksikköön varmistamalla, että CO_2:ta siirtyy riittävän nopeasti ilmasta testiliuokseen. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi lisäämällä ravistelunopeutta. Toinen mahdollisuus on vähentää CO_2:n tarvetta pienentämällä biomassan alkupitoisuutta tai lyhentämällä testin kestoa.

Pintaa, jolla viljelmät inkuboidaan, on valaistava tasaisella loistevalolla, esimerkiksi kylmänvalkoisella tai päivänvalon kaltaisella valolla. Levien ja syanobakteerien valontarpeet vaihtelevat eri kantojen välillä. Valon voimakkuus on valittava koe-eliön mukaan. Suositeltuja viherlevälajeja varten valon voimakkuus on valittava siten, että se on testiliuosten tasolla 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, kun se mitataan sopivalla mittausanturilla fotosynteesille suotuisalla aallonpituusalueella 400–700 nm. Eräät lajit, erityisesti *Anabaena flos-aquae*, kasvavat hyvin heikommassakin valaistuksessa ja voivat vahingoittua suurilla valon voimakkuuksilla. Tällaisia lajeja varten keskimääräinen valon voimakkuus on valittava alueelta 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Jos valonmittauslaitteet on kalibroitu lux-yksikköä varten, suositeltu valonvoimakkuus 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ vastaa suunnilleen kylmänvalkoisen valon voimakkuusaluetta 4 440–8 880 lux.) Valon voimakkuus saa vaihdella enintään ± 15 prosenttia inkubointialueen keskimääräisestä valon voimakkuudesta.

1.8.10 **Testin kesto**

Testi kestää yleensä 72 tuntia. Se voi kestää myös lyhyemmän tai pitemmän ajan, jos kaikki kohdassa 1.7 esitetyt validiteettivaatimukset täyttyvät.

1.8.11 **Mittaukset ja analyyttiset määritykset**

Kussakin pullossa oleva leväbiomassa määritetään ainakin kerran päivässä testijakson aikana. Jos mittauksissa käytetään testiliuoksesta pipetoituja pieniä tilavuuksia, niitä ei saa korvata vastaavilla tilavuuksilla.

Biomassa mitataan laskemalla solut manuaalisesti mikroskoopin avulla tai käyttämällä elektronista hiukkaslaskinta (solunlaskenta ja/tai biovolyymin määritys). Muutkin tekniikat, kuten virtaussytometria, klorofyllin *in vitro*- tai *in vivo* -fluoresenssin määritys (6)(7) tai optisen tiheyden määritys, ovat sallittuja, jos voidaan osoittaa, että ne korreloivat tyydyttävästi biomassan kanssa testin biomassa-arvoilla.

Liuosten pH mitataan testin alussa ja lopussa.

Jos käytettävissä on analyysimenetelmä, jolla testiaine voidaan määrittää testissä käytetyllä pitoisuusalueella, testiliuokset on analysoitava, jotta voidaan tarkistaa alkupitoisuudet sekä altistuspitoisuuksien säilyminen testin aikana.

Jos altistuspitoisuudet todennäköisesti vaihtelevat alle 20 prosenttia nimellisarvoista testin aikana, voi olla riittävää analysoida testiaineen pitoisuus testin alussa ja lopussa pienessä ja suuressa testipitoisuudessa sekä pitoisuudessa, joka on lähellä oletettua EC_{50}-arvoa. Kaikkien testipitoisuuksien analysointia testin alussa ja lopussa suositellaan silloin, kun pitoisuudet eivät pysyttele 80:n ja 120 prosentin välillä nimellispitoisuudesta. Jos testiaine on haihtuva, epästabiili tai voimakkaasti adsorboivia, suosituksena on ottaa analysoitaviksi lisänäytteitä 24 tunnin välein altistusajan kuluessa, jotta testiaineen häviö olisi helpommin määritettävissä. Tällaisia aineita varten tarvitaan ylimääräisiä toistoja. Kaikissa tapauksissa testiaineen pitoisuudet tarvitsee määrittää vain yhdestä toistossa käytetystä astiasta (tai kaikkien toistoissa käytettyjen astioiden yhdistetystä sisällöstä) kutakin testipitoisuutta kohden.

Testiviljelyaineita, jotka on valmistettu erityisesti altistuspitoisuuksien analysoimiseksi testin aikana, on käsiteltävä samalla tavalla kuin testaukseen käytettyjä liuoksia, toisin sanoen niihin on siirrostettava leviä ja niitä on inkuboitava samoissa olosuhteissa. Jos liuenneen testiaineen pitoisuus on analysoitava, voi olla tarpeen erottaa levät viljelyaineesta. Levien erottaminen on mieluimmin tehtävä sentrifugoimalla käyttämällä pientä g-voimaa, joka riittää kuitenkin niiden erottamiseen.

Jos on näyttöä siitä, että testattavan aineen pitoisuus on pysynyt tyydyttävästi ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten analysointi voi perustua nimellispitoisuuksiin tai mitattuihin alkupitoisuuksiin. Jos pitoisuus poikkeaa enemmän kuin ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta, tulosten analysoinnin on perustuttava pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon altistuksen aikana tai malleihin, jotka kuvaavat testiaineen pitoisuuden vähenemistä (3)(8).

Leväkasvun estymistesti on dynaamisempi testijärjestelmä kuin useimmat muut lyhytaikaiset kokeet, joilla testataan aineiden myrkyllisyyttä vesieliöille. Sen vuoksi todellisten altistuspitoisuuksien määritys voi olla vaikeaa varsinkin, kun on kyse adsorboituvista aineista, joita testataan pienillä pitoisuuksilla. Jos aine tällaisissa tapauksissa katoaa liuoksesta adsorboitumalla kasvavaan leväbiomassaan, se ei kuitenkaan merkitse sitä, että se olisi kadonnut koko testijärjestelmästä. Analysoitaessa testin tuloksia on tarkistettava, liittyykö testiaineen pitoisuuden väheneminen testin aikana kasvun estymisen vähenemiseen. Jos näin on, voidaan harkita sopivan mallin käyttöä kuvaamaan testiaineen pitoisuuden pienemistä (8). Muussa tapauksessa voi olla aiheellista analysoida tuloksia (nimellisten tai mitattujen) alkupitoisuuksien pohjalta.

1.8.12 **Muut havainnot**

Mikroskoopin avulla on varmistettava, että inokulaattiviljelmä näyttää normaalilta ja terveeltä, sekä tutkittava testin lopussa levissä esiintyvät epänormaaliudet (jotka voivat johtua altistumisesta testiaineelle).

1.8.13 **Rajatesti**

Joissakin tapauksissa, esimerkiksi silloin, kun alustava testi osoittaa, että testiaineella ei ole myrkkyvaikutuksia pitoisuusarvoon 100 $mg \cdot l^{-1}$ saakka tai siihen liukoisuusrajaan asti, joka testiaineella on testiviljelyaineessa (sen mukaan, kumpi näistä on pienempi), voidaan tehdä rajatesti, jossa verrataan yhden kontrolliryhmän ja yhden käsitellyn ryhmän vasteita (pitoisuudessa 100 $mg \cdot l^{-1}$ tai liukoisuusrajaa vastaavassa pitoisuudessa). On erittäin suotavaa analysoida altistuspitoisuus rajatestin tueksi. Kaikki edellä kuvatut testiolosuhteet ja validiteettivaatimukset koskevat myös rajatestiä, lukuun ottamatta käsiteltyjen toistojen määrää, jonka on oltava vähintään kuusi. Kontrolli- ja käsitellyn ryhmän vastemuuttujia voidaan analysoida Studentin t-testin kaltaisella tilastotutkimuksella, jossa verrataan keskiarvoja. Jos näiden kahden ryhmän varianssit eivät ole yhtä suuria, on tehtävä erisuuruisiin variansseihin mukautettu t-testi.

1.8.14 **Muunnos voimakkaan värillisille aineille**

Säteilytyksen (valon voimakkuuden) pitäisi olla tässä koemenetelmässä käytetyn alueen korkeimmassa päässä, vähintään 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Valotietä on lyhennettävä vähentämällä koeliuosten tilavuutta (5–25 ml).

Näytteitä on ravistettava riittävästi, jotta levät altistuvat hyvin tiheään säteilytykselle viljelmän pinnalla.

2. **TIEDOT**

2.1 KASVUKÄYRIEN PIIRTÄMINEN

Koeastioissa oleva biomassa voidaan ilmaista mittauksissa käytetyn korvaavan parametrin (esimerkiksi solumäärän ja fluoresenssin) yksikkönä.

Biomassan määritetty pitoisuus testi- ja kontrolliviljelmissä esitetään kasvukäyrien piirtämistä varten taulukkona, josta ilmenevät myös testiaineen pitoisuudet ja mittausajankohdat, jotka on rekisteröity vähintään täysien tuntien tarkkuudella. Tässä ensimmäisessä vaiheessa voi olla hyödyllistä käyttää sekä logaritmiasteikkoja että lineaarisia asteikkoja, mutta logaritmisasteikot ovat pakollisia ja antavat yleensä paremman kuvan kasvun vaihteluista testijakson aikana. On syytä huomata, että kun eksponentiaalista kasvua kuvataan logaritmiasteikolla, tuloksena on suora viiva, ja viivan kaltevuus ilmaisee spesifisen kasvunopeuden.

Käyrien avulla tutkitaan, kasvavatko kontrolliviljelmät oletetulla nopeudella eksponentiaalisesti koko testin ajan. Kaikkia datapisteitä ja käyrien muotoa tarkastellaan kriittisesti, ja raakatiedot ja menetelmät tarkistetaan mahdollisten virheiden havaitsemiseksi. Erityisesti tarkistetaan ne datapisteet, jotka näyttävät poikkeavan systemaattisen virheen vuoksi. Jos havaitaan ilmeisiä menetelmävirheitä ja/tai niitä pidetään hyvin todennäköisinä, kyseinen datapiste merkitään vieraaksi havainnoksi eikä sitä oteta huomioon myöhemmässä tilastoanalyysissä. (Jos leväpitoisuus on nolla yhdessä kahdesta tai kolmesta toistoissa käytetyssä astiassa, tämä voi olla merkki siitä, että levien siirrostamista astiaan ei ole tehty oikein tai astiaa ei ole puhdistettu kunnolla). Testiraportissa on perusteltava selvästi, minkä vuoksi datapiste on hylätty vieraana havaintona. Hyväksyttäviä syitä ovat ainoastaan (harvinaiset) menetelmävirheet eikä pelkästään huono tarkkuus. Tämäntyyppisissä ongelmissa ei ole kovin hyödyllistä yrittää tunnistaa vieraita havaintoja tilastomenetelmien avulla, eivätkä tällaiset menetelmät voi korvata asiantuntijan arviota. Vieraat havainnot (jotka on merkitty sellaisiksi) tulisi säilyttää niiden datapisteiden joukossa, jotka merkitään myöhemmin graafisiin tai taulukkomuotoisiin esityksiin.

2.2 VASTEMUUTTUJAT

Testin tarkoituksena on määrittää testiaineen vaikutukset levien kasvuun. Tässä testimenetelmässä kuvataan kahta eri vastemuuttujaa, koska jäsenvaltiot suosivat erilaisia käytänteitä ja asettavat erilaisia sääntelyvaatimuksia. Jotta testitulokset voitaisiin hyväksyä kaikissa jäsenvaltioissa, vaikutuksia olisi arvioitava käyttämällä molempia vastemuuttujia a ja b, joita kuvataan jäljempänä.

a) Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus: tämän vastemuuttujan laskentaperusteena on biomassan logaritminen kasvu päivää kohden testijakson aikana.

b) Tuotos: tällä vastemuuttujalla tarkoitetaan testin lopussa mitattua biomassaa, josta on vähennetty testin alussa mitattu biomassa.

Käytettäessä tätä menetelmää EU:n sääntelykehyksessä pitäisi tulokset laskea keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien perusteella jäljempänä selostetuista syistä. On syytä huomata, että näiden kahden vastemuuttujan avulla lasketut myrkyllisyysarvot eivät ole vertailukelpoisia, mikä on otettava huomioon käytettäessä testin tuloksia. Jos testiolosuhteet ovat tämän testimenetelmän mukaiset, keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen perustuvat EC_x-arvot (E_rC_x) ovat yleensä suurempia kuin tuotokseen perustuvat arvot (E_yC_x), mikä johtuu niiden matemaattisista perusteista. Tätä ei siis pidä tulkita siten, että näiden kahden vastemuuttujan herkkyydet olisivat erilaiset, vaan arvojen välinen ero on puhtaasti matemaattinen. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus perustuu yleiseen kasvumalliin, joka kuvaa levien eksponentiaalista kasvua rajoittamattomissa viljelmissä, joista toksisuus arvioidaan kasvunopeuteen kohdistuvien vaikutusten perusteella ottamatta huomioon kontrollin spesifisen kasvunopeuden absoluuttista tasoa, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuutta tai testin kestoa. Tuotosta kuvaavaan vastemuuttujaan perustuvat tulokset riippuvat sen sijaan kaikista näistä muista muuttujista. E_yC_x riippuu kussakin testissä käytetyn levälajin spesifisestä kasvunopeudesta ja suurimmasta spesifisestä kasvunopeudesta, joka voi vaihdella eri lajien ja jopa eri leväkantojen välillä. Tätä vastemuuttujaa ei saa käyttää vertailtaessa eri levälajien tai eri kantojenkaan herkkyyttä myrkyllisille aineille. Vaikka tieteen kannalta on parempi arvioida myrkyllisyyttä keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden perusteella, tähän testimenetelmään on otettu mukaan myös tuotokseen perustuvat myrkyllisyyden arvioinnit, koska niillä voidaan täyttää eräiden maiden nykyiset sääntelyvaatimukset.

2.2.1 **Keskimääräinen kasvunopeus**

Tietyn ajanjakson keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan biomassan logaritmisena kasvuna soveltamalla seuraavaa kaavaa kuhunkin kontrolli- ja käsittelyryhmän astiaan:

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

jossa

μ_{i-j} keskimääräinen spesifinen kasvunopeus aikavälillä *i–j*

X_i biomassa hetkellä *i*

X_j biomassa hetkellä *j*.

Kullekin testiryhmälle ja kontrolliryhmälle lasketaan kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan koko testin ajalta (yleensä päivästä 0 päivään 3) käyttämällä lähtöarvona siirrostetun biomassan nimellisarvoa mitatun lähtöarvon sijasta, koska näin saadaan yleensä parempi tarkkuus. Biomassan mitattua alkupitoisuutta voidaan käyttää, jos inokulaatin pieni biomassa voidaan määrittää riittävän tarkasti biomassan mittauslaitteella (esimerkiksi virtaussytometrilla). Lisäksi määritetään jaksoittainen kasvunopeus, joka saadaan laskemalla spesifiset kasvunopeudet kultakin päivältä testin aikana (päivät 0–1, 1–2 ja 2–3), ja tutkitaan, pysyykö kontrolliryhmän kasvunopeus vakiona (ks. validiteettivaatimukset, kohta 1.7). Jos spesifinen kasvunopeus on huomattavasti pienempi ensimmäisenä päivänä kuin spesifisten kasvunopeuksien keskiarvo, se voi olla merkki viivevaiheesta. Vaikka viivevaihe voidaan minimoida ja poistaa käytännössä kokonaan kontrolliviljelmistä esiviljelmän asianmukaisella lisäyksellä, testiaineelle altistetuissa viljelmissä viivevaihe voi osoittaa toipumista toksisuuden aiheuttamasta alkustressistä tai vähentynyttä altistumista, joka johtuu testiaineen häviämisestä (esimerkiksi sorptiosta levämassaan) alkuvaiheen altistumisen jälkeen. Tällöin voidaan tarkastella jaksoittaista kasvunopeutta, jonka avulla voidaan arvioida testiaineen vaikutuksia altistusaikana. Merkittävät erot jaksoittaisen kasvunopeuden ja keskimääräisen kasvunopeuden välillä osoittavat, että kasvu poikkeaa jatkuvasta eksponentiaalisesta kasvusta, jolloin kasvukäyriä on syytä tarkastella lähemmin.

Kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen kussakin käsitellyssä toistossa lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa

$\%I_r$ keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen

μ_C keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden (μ) keskiarvo kontrolliryhmässä

μ_T keskimääräinen spesifinen kasvunopeus käsitellyssä toistossa.

Jos testiliuosten valmistamisessa käytetään liuottimia, kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen on laskettava liuottimia sisältävistä kontrolliviljelmistä eikä niistä kontrolliviljelmistä, joissa ei ole liuottimia.

2.2.2 **Tuotos**

Tuotos lasketaan vähentämällä testin lopussa mitatusta biomassasta testin alussa mitattu biomassa kontrolli- ja käsittelyryhmän kunkin astian osalta. Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen. Tuotoksen prosentuaalinen estyminen ($\%\ I_y$) voidaan laskea kutakin käsiteltyä toistoa varten seuraavasti:

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

jossa

$\%\ I_y$ tuotoksen prosentuaalinen estyminen

Y_C tuotoksen keskiarvo kontrolliryhmässä

Y_T tuotoksen arvo käsitellyssä toistossa.

2.3 PITOISUUS-VASTEKÄYRÄN PIIRTÄMINEN

Prosentuaalinen estyminen merkitään graafisesti suhteessa testiaineen pitoisuuden logaritmiin. Näin saatuja pisteitä tarkastellaan huolellisesti ottamatta huomioon datapisteitä, joita pidettiin ensimmäisessä vaiheessa vieraina havaintoina. Datapisteiden kautta vedetään tasaisesti muuttuva viiva joko silmämääräisesti tai interpoloimalla tietokoneen avulla, jotta pitoisuuden ja vasteen suhteesta saataisiin alustava käsitys. Tämän jälkeen käytetään tarkempaa menetelmää, mieluimmin tietokonepohjaista tilastomenetelmää. Sen perusteella, mihin tietoja aiotaan käyttää, mikä on niiden laatu (tarkkuus) ja määrä ja mitä välineitä on käytettävissä niiden analysoimiseen, voidaan päättää, että tietojen analysointi lopetetaan tähän vaiheeseen (mikä on joskus hyvin aiheellisestakin), ja ainoastaan lukea keskeiset arvot EC_{50} ja EC_{10} (ja/tai EC_{20}) silmämääräisesti piirretyltä käyrältä (ks. myös jäljempänä oleva kohta stimuloivista vaikutuksista). Päteviä syitä olla käyttämättä tilastomenetelmää ovat muun muassa seuraavat syyt:

— Vaikka tietoja käsiteltäisiin tietokoneistetulla menetelmällä, tulokset eivät olisi sen luotettavampia kuin jos tiedot olisi annettu asiantuntijan arvioitaviksi. Tällaisissa tapauksissa on jopa mahdollista, että eräillä tietokoneohjelmilla ei saada minkäänlaista luotettavaa tulosta (esimerkiksi sen vuoksi, että iteraatiot eivät konvergoidu).

— Tietokoneohjelmilla ei pystytä käsittelemään kunnolla stimuloinnin aiheuttamia kasvuvasteita (ks. jäljempänä).

2.4 TILASTOMENETELMÄT

Tavoitteena on saada kvantitatiivinen pitoisuus–vaste-suhde regressioanalyysin avulla. Painotettua lineaarista regressiota voidaan käyttää sen jälkeen, kun vastetiedoille on tehty linearisoiva muunnos – esimerkiksi probitti-, logitti- tai Weibull-yksiköiksi (9) – mutta suositeltavampaa on käyttää epälineaarisia regressiomenetelmiä, joilla voidaan paremmin käsitellä tiedoissa väistämättä esiintyviä epäsäännöllisyyksiä sekä poikkeamia tasaisista jakaumista. Lähestyttäessä tilaa, jossa kasvu ei esty ollenkaan tai estyminen on täydellistä, linearisoiva muunnos voi suurentaa epäsäännöllisyyksiä ja haitata siten analyysiä (9). On syytä huomata, että standardianalyysimenetelmät, joissa käytetään probitti-, logitti- tai Weibull-muunnoksia, on tarkoitettu dikotomisia tietoja varten (kun vasteita on kaksi, esimerkiksi kuolleisuus tai eloonjääminen), minkä vuoksi niitä on mukautettava, jos niitä aiotaan käyttää kasvu- tai tuotostietojen analysointiin. Kirjallisuusviitteissä (10), (11) ja (12) kuvataan erityismenetelmiä, joilla EC_x-arvot voidaan määrittää jatkuvista tiedoista. Epälineaarisen regressioanalyysin käyttöä käsitellään tarkemmin lisäyksessä 4.

Kunkin vastemuuttujan analysoimiseksi käytetään pitoisuus–vaste-suhdetta, jonka avulla lasketaan EC_x-arvojen piste-estimaattit. Jokaiselle estimaatille on määritettävä 95 prosentin luottamusväli, jos se on mahdollista. Vastetietojen ja regressiomallin välinen yhteensopivuuden aste on arvioitava joko graafisesti tai tilastollisesti. Regressionanalyysi on tehtävä käyttämällä yksittäisiä toistojen vasteita eikä käsittelyryhmien keskiarvoja. Jos epälineaariseen käyrän sovitus on vaikeaa tai mahdotonta, koska tiedot ovat liian hajallaan, ongelma voidaan kiertää tekemällä regressio ryhmien keskiarvoille, mikä on käytännöllinen tapa vähentää mahdollisten vieraiden havaintojen vaikutusta. Tämän vaihtoehdon käyttö on mainittava testiraportissa tavanomaisesta menetelmästä poikkeavana keinona, jota on käytetty sen vuoksi, että käyrän sovittaminen yksittäisiin toistoihin ei antanut hyvää tulosta.

EC_{50}-estimaatit ja luottamusvälit voidaan saada myös käyttämällä lineaarista interpolointia bootstrap-menetelmän kanssa (13), jos käytettävissä olevat regressiomallit tai -menetelmät eivät sovellu kyseisten tietojen käsittelyyn.

Jotta voidaan arvioida LOEC-pitoisuus ja siten myös NOEC-pitoisuus sekä testiaineen vaikutukset kasvunopeuteen, käsiteltyjen liuosten keskiarvoja on verrattava varianssianalyysitekniikoiden avulla (ANOVA). Sen jälkeen on verrattava kunkin pitoisuuden keskiarvoa kontrolliryhmän keskiarvoon käyttämällä sopivaa moniulotteista vertailumenetelmää tai trenditestimenetelmää. Dunnettin tai Williamsin testi voi olla käyttökelpoinen (14)(15)(16)(17)(18). Lisäksi on arvioitava, pitääkö ANOVA-oletus varianssin homogeenisuudesta paikkansa. Arviointi voidaan tehdä graafisesti tai virallisen testin avulla (18). Sopivia testejä ovat Levenen ja Bartlettin testit. Jos oletus varianssin homogeenisuudesta ei pidä paikkaansa, tilanne on joskus korjattavissa tietojen logaritmimuunnoksella. Jos varianssin heterogeenisuus on erittäin suuri eikä se ole korjattavissa muunnoksella, on harkittava analysointia sellaisilla menetelmillä kuin Jonckheeren alaspäin askeltava trenditesti. Kirjallisuusviitteessä (12) annetaan lisäohjeita NOEC-arvon määrittämisestä.

Tieteen viimeaikaisen kehityksen perusteella on suositeltu, että NOEC-käsitteestä luovuttaisiin ja se korvattaisiin regressioanalyysiin perustuvilla EC_x:n piste-estimaateilla. Sopivaa x:n arvoa ei ole vielä vahvistettu tätä levätestiä varten. Sopivalta vaikuttaisi väli 10–20 prosenttia (valitun vastemuuttujan mukaan), ja suositeltavaa on ilmoittaa sekä EC_{10}- että EC_{20}-arvo.

2.5 KASVUN EDISTYMINEN

Pienissä pitoisuuksissa havaitaan joskus kasvun edistymistä (negatiivista estymistä). Tämä voi johtua joko hormesis-vaikutuksesta (”toksisuudesta johtuva kasvun edistyminen”) tai stimuloivien kasvutekijöiden lisäämisestä testiaineen kanssa testissä käytettyyn minimaaliseen viljelyaineeseen. On muistettava, että epäorgaanisten ravinteiden lisäämisellä ei pitäisi olla suoranaista vaikutusta, koska testiliuoksessa on oltava ravinteita ylimäärin koko testin ajan. Pieniannoksinen stimulointi voidaan yleensä jättää huomioimatta EC_{50}-arvon laskemisessa, jollei se ole hyvin merkittävää. Jos se on merkittävää tai jos EC_x-arvo on laskettava pientä x:n arvoa varten, voi olla tarpeen käyttää erityismenetelmiä. Stimuloinnin aiheuttamien vasteiden poistamista tietojen analysoinnista olisi vältettävä mahdollisuuksien mukaan, ja jos käytettävissä oleva käyränsovitusohjelmisto ei pysty käsittelemään vähäistä stimulointia, voidaan käyttää lineaarista interpolointia yhdessä bootstrap-menetelmän kanssa. Jos stimulointi on hyvin merkittävää, voidaan harkita hormesis-mallin käyttöä (19).

2.6 MUUSTA KUIN TOKSISUUDESTA JOHTUVA KASVUN ESTYMINEN

Valoa absorboivat testimateriaalit voivat hidastaa kasvunopeutta, koska varjostus vähentää käytettävissä olevan valon määrää. Tällaiset fysikaaliset vaikutukset olisi erotettava myrkkyvaikutuksista muuttamalla testiolosuhteita, ja fysikaalisista vaikutuksista olisi raportoitava erikseen. Tästä annetaan ohjeita kirjallisuusviitteissä (2) ja (3).

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, joilla on merkitystä, muun muassa vesiliukoisuuden raja-arvo,

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna puhtaus.

Koelajit:

— kanta, sen toimittaja tai lähde ja viljelyolosuhteet.

Testiolosuhteet:

— testin alkamispäivä ja kesto,

— koejärjestelyn kuvaus: koeastiat, viljelmien tilavuudet ja biomassan tiheys testin alussa,

— viljelyaineen koostumus,

— testipitoisuudet ja toistot (esimerkiksi toistojen määrä, testipitoisuuksien määrä ja testissä käytetty geometrinen porrastus),

— kuvaus testiliuosten valmistamisesta, muun muassa liuottimien käyttö,

— viljelylaite,

— valon voimakkuus ja laatu (lähde, homogeenisuus),

— lämpötila,

— testatut pitoisuudet: nimelliset testipitoisuudet ja mahdolliset tulokset analyyseistä, joilla on määritetty testiaineen pitoisuus koeastioissa. Menetelmän saantoteho ja määritysraja testimatriisissa on ilmoitettava,

— kaikki poikkeamat tästä testimenetelmästä,

— biomassan määritysmenetelmä sekä näyttö mitatun parametrin ja kuivapainon korrelaatiosta.

Tulokset:

— pH-arvot kokeen alussa ja lopussa kaikista käsittelyistä,

— kussakin pullossa oleva biomassa kunakin mittausajankohtana sekä biomassan mittausmenetelmä,

— kasvukäyrät (biomassa ajan funktiona),

— kunkin käsitellyn toiston lasketut vastemuuttujat sekä toistojen keskiarvot ja variaatiokerroin,

— pitoisuuden ja vaikutuksen suhteen graafinen esitys,

— myrkyllisyyden arvioinnit vastemuuttujien osalta, esimerkiksi EC_{50}, EC_{10} ja EC_{20}, ja vastaavat luottamusvälit; LOEC- ja NOEC-pitoisuudet, jos ne on laskettu, ja niiden määrityksessä käytetyt tilastomenetelmät,

— jos on käytetty ANOVA-analyysiä, havaittavissa olevan vaikutuksen suuruus (esimerkiksi vähiten merkitsevä erotus),

— mahdollinen kasvun edistyminen käsitellyissä liuoksissa,

— muut havaitut vaikutukset, esimerkiksi levien morfologiset muutokset,

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

4. KIRJALLISUUS

(1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

(2) ISO 1998: Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

(3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

(4) ISO 1998: Water quality – Sampling – Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

(5) ISO 1993: Water quality – Algal growth inhibition test. ISO 8692.

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

(7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), s. 919–925.

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

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

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

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

(12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

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

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

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

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

(17) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

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

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

Lisäys 1

Testiin sopivat kannat

Viherlevät

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

— *Desmodesmus subspicatus* (aiemmin *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Piilevät

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Syanobakteerit

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

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Kantojen alkuperä

Suositellut kannat ovat saatavissa vain yhtä levää sisältävinä viljelminä seuraavista kokoelmista (jotka luetellaan aakkosjärjestyksessä):

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

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

Sammlung von Algenkulturen
Albrecht-von-Haller-Institut
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
3400 Göttingen
GERMANY

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

Suositeltujen lajien ulkonäkö ja ominaisuudet

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Ulkonäkö	Kaarevia ja kierteisiä yksittäisiä soluja	Soikeita, yleensä yksittäisiä soluja	Sauvoja	Soikeiden solujen muodostamia ketjuja	Sauvoja
Koko (pituus × leveys) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Solutilavuus (μm^3/solu)	40–60 (1)	60–80 (1)	40–50 (1)	30–40 (1)	2,5 (2)
Solujen kuivapaino (mg/solu)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Kasvunopeus (3) (päivä$^{-1}$)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Elektronisella hiukkaslaskimella mitattuna.
(2) Koon perusteella laskettuna.
(3) Yleisimmin havaittu kasvunopeus OECD-viljelyaineessa, kun valon voimakkuus on noin 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ja lämpötila 21 °C.

Suositeltujen koelajien viljelyä ja käsittelyä koskevat erityissuositukset

Pseudokirchneriella subcapitata ja Desmodesmus subspicatus

Näitä viherleviä on yleensä helppo ylläpitää erilaisissa viljelyaineissa. Kantakokoelmia pitävät laitokset antavat tietoja sopivista viljelyaineista. Solut ovat yleensä yksittäisinä soluina, ja solutiheys on helposti mitattavissa elektronisen hiukkaslaskimen tai mikroskoopin avulla.

Anabaena flos-aquae

Kantaviljelmää voidaan pitää erilaisissa viljelyaineissa. On erityisen tärkeää huolehtia siitä, että panoskasvatuksessa ei ohiteta kasvun viivevaihetta vaihdon yhteydessä, koska muuten palautuminen on vaikeaa.

Anabaena flos-aquae muodostaa solurihmoista vyyhtimäisiä kasaumia. Näiden kasaumien koko voi vaihdella viljelyolosuhteiden mukaan. Voi olla tarpeen rikkoa nämä kasaumat, jos biomassan määrityksessä käytetään mikroskooppilaskentaa tai elektronista hiukkaslaskinta.

Rihmojen pilkkomiseen voidaan käyttää osanäytteiden ultraäänihajotusta, millä voidaan vähentää laskentatulosten vaihtelevuutta. Solut voivat kuitenkin tuhoutua, jos ultraäänihajotusta jatketaan kauemmin kuin rihmojen pilkkominen lyhyemmiksi kappaleiksi edellyttää. Ultraäänihajotuksen voimakkuuden ja keston on oltava sama kaikissa käsittelyissä.

Hemosytometrilla lasketaan riittävän monta kenttää (vähintään 400 solua) vaihtelevuuden tasoittamiseksi. Tämä parantaa mikroskooppisten tiheysmääritysten luotettavuutta.

Kun solurihmat on pilkottu huolellisella ultraäänihajotuksella, Anabaena-solujen kokonaistilavuus voidaan määrittää elektronisella hiukkaslaskimella. Ultraäänihajotuksen energia on säädettävä siten, etteivät solut rikkoudu.

Käyttämällä Vortex-ravistelijaa tai muuta vastaavaa menetelmää varmistetaan, että leväsuspensio, jota käytetään koeastioiden siirostamiseen, on hyvin sekoitettu ja homogeeninen.

Koeastiat on sijoitettava tasoravistelijaan, joka tekee edestakaista tai orbitaaliliikettä frekvenssillä 150 rpm. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää jaksoittaista ravistelua, joka vähentää Anabaenan taipumusta muodostaa rykelmiä. Jos rykelmiä kuitenkin muodostuu, on varmistettava, että biomassan mittauksia varten saadaan edustavia näytteitä. Ennen näytteiden ottoa voi olla tarpeen ravistella astioita voimakkaasti levärykelmien hajottamiseksi.

Synechococcus leopoliensis

Kantaviljelmää voidaan pitää erilaisissa viljelyaineissa. Kantakokoelmia pitävät laitokset antavat tietoja sopivista viljelyaineista.

Synechococcus leopoliensis kasvaa yksittäisinä sauvanmuotoisina soluina. Solut ovat hyvin pieniä, mikä vaikeuttaa mikroskooppilaskennan käyttöä biomassan mittauksissa. Elektroniset hiukkaslaskimet, joilla voidaan laskea jopa noin 1 µm:n suuruisia hiukkasia, ovat käyttökelpoisia. Lisäksi voidaan käyttää *in vitro* -fluoresenssimittauksia.

Navicula pelliculosa

Kantaviljelmää voidaan pitää erilaisissa viljelyaineissa. Kantakokoelmia pitävät laitokset antavat tietoja sopivista viljelyaineista. Viljelyaineissa on oltava silikaattia.

Navicula pelliculosa voi tietyissä kasvuolosuhteissa muodostaa kasaumia. Lipidituotannon vuoksi leväsolut pyrkivät joskus kerääntymään pintakalvoon. Siinä tapauksessa on ryhdyttävä erityistoimiin, jotta biomassan määritykseen saadaan edustavat osanäytteet. Voimakas ravistelu esimerkiksi Vortex-ravistimella voi olla tarpeen.

Lisäys 2

Viljelyaine

Tässä testimenetelmässä voidaan käyttää jompaakumpaa seuraavista viljelyaineista:

OECD-viljelyaine: alkuperäinen OECD:n testiohjeen nro 201 mukainen viljelyaine, joka on myös ISO 8692 -standardin mukainen.

Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston (US EPA) viljelyaine AAP, joka on myös ASTM-standardin mukainen.

Näitä viljelyaineita valmistettaessa on käytettävä reagenssi- tai analyysilaatua olevia kemikaaleja ja deionisoitua vettä.

AAP-viljelyaineen (US EPA) ja OECD:n testiohjeen nro 201 mukaisen viljelyaineen koostumus

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

(*) EDTA:n ja raudan moolisuhde on hieman suurempi kuin yksi. Näin estetään raudan saostumisen ja minimoidaan samalla raskasmetalli-ionien kelatoituminen.

Testissä, jossa käytetään *Navicula pelliculosa* -piilevää, molempiin viljelyaineisiin on lisättävä $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$:ta, kunnes Si-pitoisuudeksi saadaan 1,4 mg/l.

Viljelyaineen pH saadaan, kun viljelyaineen karbonaattijärjestelmä ja CO_2:n osapaine ilmassa ovat päässeet tasapainoon. Viljelyaineen pH:n ja molaarisen bikarbonaattipitoisuuden likimääräinen suhde 25 °C:ssa saadaan seuraavan kaavan avulla:

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

Kun $NaHCO_3$ on 15 mg/l, pH_{eq} = 7,5 (US EPA -viljelyaine), ja kun $NaHCO_3$ on 50 mg/l, pH_{eq} = 8,1 (OECD-viljelyaine).

Testiviljelyaineen alkuainekoostumus

Alkuaine	EPA	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

OECD-viljelyaineen valmistus

Ravinne	Pitoisuus kantaliuoksessa
Kantaliuos 1: makroravinteet	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Kantaliuos 2: rauta	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Kantaliuos 3: hivenaineet	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Kantaliuos 4: bikarbonaatti	
$NaHCO_3$ $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	50 $g \cdot l^{-1}$

Kantaliuokset steriloidaan kalvosuodatuksella (keskimääräinen huokoskoko 0,2 µm) tai autoklavoimalla (120 °C, 15 min). Liuoksia säilytetään pimeässä 4 °C:n lämpötilassa.

Kantaliuoksia 2 ja 4 ei saa autoklavoida, vaan ne on steriloitava kalvosuodatuksella.

Viljelyaine valmistetaan lisäämällä veteen sopiva määrä kantaliuoksia 1–4:

Noin 500 ml:aan steriloitua vettä lisätään:

— 10 ml kantaliuosta 1

— 1 ml kantaliuosta 2

— 1 ml kantaliuosta 3

— 1 ml kantaliuosta 4.

Liuokseen lisätään steriloitua vettä, kunnes tilavuus on 1 000 ml.

Sen jälkeen on odotettava niin kauan kunnes viljelyaine ja ilman CO_2 ovat päässeet tasapainoon. Tarvittaessa liuokseen johdetaan tätä varten steriiliä suodatettua ilmaa muutaman tunnin ajan.

AAP-viljelyaineen valmistus

A1.1 Lisätään 1 ml kutakin kohdassa A1.2.1–A1.2.7 mainittua kantaliuosta noin 900 ml:aan deionisoitua tai tislattua vettä ja laimennetaan liuos 1 litraksi.

A1.2 Makroravinteita sisältävät kantaliuokset valmistetaan liuottamalla seuraavat aineet 500 ml:aan deionisoitua tai tislattua vettä. Reagenssit A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 ja A1.2.4 voidaan yhdistää yhdeksi kantaliuokseksi.

A1.2.1 $NaNO_3$ – 12,750 g

A1.2.2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 6,082 g

A1.2.3 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2,205 g

A1.2.4 *Mikroravinteita sisältävä kantaliuos* – (ks. A1.3)

A1.2.5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 7,350 g

A1.2.6 K_2HPO_4 – 0,522 g

A1.2.7 $NaHCO_3$ – 7,500 g

A1.2.8 $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ – ks. huomautus A1.1.

HUOMAUTUS A1.1 – Käytetään vain piilevälajien viljelyssä. Voidaan lisätä suoraan (202,4 mg) tai kantaliuoksessa, jotta viljelyaineen lopulliseksi Si-pitoisuudeksi saadaan 20 mg/l.

A1.3 Makroravinteita sisältävä kantaliuos valmistetaan liuottamalla seuraavat aineet 500 ml:aan deionisoitua tai tislattua vettä.

A1.3.1 H_3BO_3 – 92,760 mg

A1.3.2 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 207,690 mg

A1.3.3 $ZnCl_2$ – 1,635 mg

A1.3.4 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 79,880 mg

A1.3.5 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,714 mg

A1.3.6 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 3,630 mg

A1.3.7 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,006 mg

A1.3.8 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ – 150,000 mg

[Dinatrium(eteenidinitrilo)tetra-asetaatti]

A1.3.9 $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,005 mg – ks. huomautus A1.2.

HUOMAUTUS A1.2 – Käytetään kantaviljelmien viljelyaineessa vain, kun viljellään piilevälajeja.

A1.4 Säädetään pH arvoon 7,5 ± 0,1 käyttämällä 0,1 *N* tai 1,0 *N* NaOH:a tai HCl:a.

A1.5 Viljelyaine suodatetaan steriiliin astiaan kalvosuodattimen läpi, jonka huokoskoko on 0,22 µm, jos käytetään hiukkaslaskinta. Jollei käytetä hiukkaslaskinta, huokoskoko on 0,45 µm.

A1.6 Viljelyainetta säilytetään käyttöön saakka pimeässä noin 4 °C:een lämpötilassa.

Lisäys 3

Esimerkki levänviljelymenetelmästä

Yleisiä huomautuksia

Tässä kuvattavan menetelmän avulla voidaan viljellä leviä myrkyllisyyskokeita varten.

Sopivien menetelmien avulla on varmistettava, että leväviljelmissä ei ole bakteeritartuntaa. Aina on varmistettava, että viljelmissä esiintyy vain yhtä levälajia. Tämä pätee myös käytettäessä akseenisia viljelmiä.

Bakteerien tai muiden levien pääsy viljelmään on estettävä tekemällä kaikki toimet steriileissä olosuhteissa.

Välineet ja materiaalit

Ks. testimenetelmän kohta ”Välineet”.

Leväviljelmien tuottaminen

Ravintoliuosten (viljelyaineiden) valmistus:

Kaikki viljelyaineen ravintosuolat valmistetaan väkevänä kantaliuoksena, ja niitä säilytetään pimeässä ja viileässä. Liuokset steriloidaan suodattamalla tai autoklavoimalla.

Viljelyaine valmistetaan lisäämällä sopiva määrä kantaliuosta steriiliin tislattuun veteen. Samalla on huolehdittava siitä, ettei synny infektioita. Jos viljelyaine on kiinteää, lisätään 0,8 prosenttia agaria.

Kantaviljelmä:

Kantaviljelmät ovat pieniä leväviljelmiä, jotka siirretään säännöllisesti tuoreeseen viljelyaineeseen, jossa ne toimivat testin alkumateriaalina. Jos viljelmiä ei käytetä säännöllisesti, ne valutetaan kallistettuihin agarputkiin. Putket siirretään tuoreeseen viljelyaineeseen vähintään kahden kuukauden väliajoin.

Kantaviljelmiä viljellään sopivaa viljelyainetta sisältävissä erlenmeyerpulloissa (tilavuus noin 100 ml). Jos leviä inkuboidaan 20 °C:ssa jatkuvassa valaistuksessa, siirrot on tehtävä viikoittain.

Siirrossa ”vanhan” viljelmän osa siirretään steriilin pipetin avulla tuoretta viljelyainetta sisältävään pulloon. Jos laji on nopeasti kasvava, alkupitoisuuden on oltava noin sadasosa vanhan viljelmän pitoisuudesta.

Lajin kasvunopeus voidaan määrittää kasvukäyrän avulla. Näin on mahdollista arvioida, kuinka usein viljelmä on siirrettävä uuteen viljelyaineeseen. Siirto on tehtävä ennen kuin viljelmä kuolee.

Esiviljely:

Esiviljelyn avulla saadaan levämäärä, joka on sopiva testiviljelmien siirrostukseen. Esiviljelmää inkuboidaan testiolosuhteissa, ja viljelmä käytetään sen ollessa vielä eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, yleensä 2–4 päivän pituisen inkubaation jälkeen. Leväviljelmät, jotka sisältävät epämuodostuneita tai poikkeavia soluja, on hylättävä.

Lisäys 4

Tietojen analysointi epälineaarisen regression avulla

Yleisiä huomautuksia

Levätesteissä ja muissa testeissä, joissa mitataan mikro-organismien kasvua (biomassan kasvua), vastetta kuvaava muuttuja on luonnostaan jatkuva ja metrinen: prosessin nopeus, jos käytetään kasvunopeutta, ja sen integraali ajan funktiona, jos käytetään biomassaa. Molempia muuttujia verrataan toistoina tehtyjen altistumattomien kontrollien vastaavaan keskimääräiseen vasteeseen ottaen huomioon, että kontrollit reagoivat maksimaalisesti kulloisinkiin olosuhteisiin; levätestissä valo ja lämpötila ovat pääasialliset määräävät tekijät. Järjestelmä voi olla jakautunut tai homogeeninen, ja biomassaa voidaan pitää jatkumona ottamatta huomioon yksittäisiä soluja. Tämän järjestelmän vastetyypin varianssin jakautuminen riippuu ainoastaan testiolosuhteista (joille on luonteenomaista virheiden logaritmiset normaalijakaumat tai normaalijakaumat). Tämä poikkeaa tyypillisistä dikotomisista vasteista biologisissa testeissä, joissa oletetaan usein, että yksittäisten organismien toleranssi (jolle on tyypillistä binomijakauma) on hallitseva varianssikomponentti. Tällöin kontrollivasteet ovat nolla tai taustan tasoa.

Normalisoitu tai suhteellinen vaste r pienenee yksinkertaisessa tapauksessa tasaisesti 1:stä (ei kasvun estymistä) 0:aan (100-prosenttinen estyminen). On muistettava, että kaikkiin vasteisiin liittyy virhe ja että ilmeinen negatiivinen kasvun estyminen voi laskelmissa johtua pelkästään satunnaisvirheestä.

Regressioanalyysi

Mallit

Regressioanalyysin tavoitteena on kuvata pitoisuus-vastekäyrää matemaattisena regressiofunktiona $Y = f(C)$ tai yleisemmin $F(Z)$, jossa $Z = \log C$. Käänteisesti funktio $C = f^{-1}(Y)$ antaa mahdollisuuden laskea EC_x-arvot, kuten EC_{50}-, EC_{10}- ja EC_{20}-arvot, ja niiden 95 prosentin luottamusvälit. Useiden yksinkertaisten matemaattisten funktioiden on todettu soveltuvan pitoisuus–vaste-suhteen kuvaamiseen leväkasvun estymistesteissä. Niihin kuuluvat muun muassa logistinen kaava, epäsymmetrinen Weibull-jakauma ja logaritminen normaalijakauma, jotka ovat kaikki S-käyriä, jotka lähestyvät asymptoottisesti arvoa yksi, kun $C \rightarrow 0$, ja nollaa, kun $C \rightarrow$ ääretön.

Jatkuvan kynnysfunktion malleja (esimerkiksi Kooijmanin malli, joka kuvaa populaation kasvun estymistä, Kooijman et al., 1996) on hiljattain ehdotettu vaihtoehdoiksi asymptoottisille malleille. Tällaisissa malleissa oletetaan, että vaikutuksia ei esiinny tiettyä kynnysarvoa EC0+ pienemmillä pitoisuuksilla. Tämä pitoisuus arvioidaan ekstrapoloimalla vaste–pitoisuussuhde siten, että se leikkaa pitoisuusakselin, käyttämällä yksinkertaista jatkuvaa funktiota, joka ei ole differentioituva lähtöpisteessä.

Analyysinä voi olla jäännösneliösummien yksinkertainen minimointi (kun varianssin oletetaan olevan vakio) tai painotettujen neliösummien yksinkertainen minimointi, jos varianssin heterogeenisuus kompensoidaan.

Menettely

Menettely on seuraava: Valitaan sopiva funktionaaliyhtälö $Y = f(C)$ ja sovitetaan se tietoihin epälineaarisella regressiolla. Tässä yhteydessä on parempi käyttää jokaisesta yksittäisestä pullosta tehtyjä mittauksia kuin toistojen keskiarvoja, jotta tiedoista saataisiin mahdollisimman paljon informaatiota. Toisaalta käytännön kokemus viittaa siihen, että jos varianssi on suuri, toistojen keskiarvoilla saadaan luotettavampi matemaattinen arviointi, johon tiedoissa esiintyvät satunnaisvirheet eivät vaikuta yhtä paljon kuin jos jokainen yksittäinen datapiste säilytettäisiin.

Sovitettu käyrä ja mitatut tiedot esitetään graafisesti, minkä jälkeen tutkitaan, onko käyrä sovitettu asianmukaisesti. Jäännösten analysointi voi olla erityisen käyttökelpoinen keino tähän tarkoitukseen. Jos pitoisuus–vaste-käyrän kuvaamiseen valittu funktionaalinen suhde ei kuvaa hyvin koko käyrää tai jotain sen olennaista osaa, kuten vastetta pienillä pitoisuuksilla, valitaan toisenlainen käyränsovitus, esimerkiksi Weibull-funktion kaltainen epäsymmetrinen käyrä symmetrisen käyrän sijasta. Negatiiviset inhibitiot voivat olla ongelmallisia muun muassa logaritmisen normaalijakauman yhteydessä ja voivat

vaatia vaihtoehtoisen regressiofunktion käyttöä. Ei ole suositeltavaa merkitä näitä negatiivisia arvoja nollaksi tai antaa niille pientä positiivista arvoa, koska se vääristää virhejakaumaa. Voi olla aiheellista tehdä erilliset käyränsovitukset joillekin käyrän osille, esimerkiksi sille osalle, jossa kasvun estyminen on pientä, $EC_{pieni\ x}$-estimaattien määrittämiseksi. Sovitetusta yhtälöstä lasketaan (käänteisfunktiolla $C = f^{-1}(Y)$) EC_x:n luonteenomaiset piste-estimaatit, ja niistä ilmoitetaan ainakin EC_{50}-arvo ja yksi tai kaksi $EC_{pieni\ x}$-arvoa. Käytännön testauksesta saadut kokemukset ovat osoittaneet, että levätestillä saadaan yleensä kohtuullisen tarkka arviointi pitoisuuksilla, joilla kasvun estyminen on 10-prosenttista, jos datapisteitä on riittävästi ja pienillä pitoisuuksilla ei esiinny kasvun edistymistä häiritsevänä tekijänä. EC_{20}-estimaatin tarkkuus on yleensä huomattavasti parempi kuin EC_{10}-estimaatin, koska EC_{20} sijaitsee yleensä pitoisuus–vaste-käyrän keskiosan lähes lineaarisessa osassa. Joskus EC_{10}-arvoa voi olla vaikea tulkita kasvun edistymisen vuoksi. Sen vuoksi on suositeltavaa ilmoittaa aina myös EC_{20}-arvo, vaikka EC_{10}-arvo saadaankin yleensä riittävän tarkasti.

Painotuskertoimet

Testissä varianssi ei yleensä ole vakio, ja tavallisesti siihen sisältyy suhteellinen komponentti. Sen vuoksi on hyödyllistä tehdä painotettu regressio rutiininomaisesti. Tähän analyysin tarvittavien painotuskertoimien oletetaan yleensä olevan käänteisesti verrannollisia varianssiin:

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

Monet regressio-ohjelmat antavat mahdollisuuden tehdä painotettu regressioanalyysi painotuskertoimilla, jotka valitaan taulukosta. Painotuskertoimet voidaan helposti normalisoida kertomalla ne luvulla $n/\Sigma\, w_i$ (jossa n on datapisteiden määrä), jotta niiden summa olisi yksi.

Vasteiden normalisointi

Normalisointi kontrollien keskimääräisen vasteen avulla aiheuttaa joitakin periaatteellisia ongelmia ja johtaa melko mutkikkaaseen varianssirakenteeseen. Vastearvojen jakaminen kontrollien keskimääräisellä vastearvolla kasvunestymisprosentin määrittämiseksi aiheuttaa lisävirheen, joka johtuu kontrollien keskiarvoon liittyvästä virheestä. Jollei tämä virhe ole mitättömän pieni, regressioon sovellettavat painotuskertoimet ja luottamusvälit on korjattava ottaen huomioon kovarianssi kontrollin kanssa (17). On tärkeää, että kontrollien keskimääräinen vaste arvioidaan hyvin tarkasti, jotta voidaan minimoida suhteellisen vasteen kokonaisvarianssi. Varianssi saadaan seuraavasti:

(Alaindeksi i tarkoittaa pitoisuutta i ja alaindeksi 0 tarkoittaa kontrolleja.)

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

kun varianssi on:

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

ja koska

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

kun data on normaalisti jakautunut ja m_i ja m_0 ovat toistoja:

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

suhteellisen vasteen Y_i kokonaisvarianssi on:

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

Kontrollien keskiarvoon liittyvä virhe on kääntäen verrannollinen niiden kontrollitoistojen määrän neliöjuureen, joista keskiarvo on laskettu. Joskus voi olla aiheellista ottaa mukaan aiempia tietoja, jotta virhettä voidaan pienentää merkittävästi. Vaihtoehtoisena menetelmänä on, että tietoja ei normalisoida eikä absoluuttisia vasteita soviteta, kontrolleja koskevat vastetiedot mukaan luettuina, vaan kontrollivasteen arvo otetaan käyttöön lisäparametrina, joka sovitetaan epälineaarisella regressiolla. Käytettäessä tavanomaista kahden parametrin regressioyhtälöä, tämä menetelmä edellyttää kolmen parametrin sovittamista ja vaatii sen vuoksi enemmän datapisteitä kuin sellaisten tietojen epälineaarinen regressio, jotka on normalisoitu käyttämällä ennalta määritettyä kontrollivastetta.

Käänteiset luottamusvälit

On melko monimutkaista laskea epälineaarisen regression luottamusvälit estimoimalla käänteisfunktion avulla, eikä tätä vaihtoehtoa ole saatavilla tavanomaisissa tilasto-ohjelmistopaketeissa. Likimääräiset luottamusvälit voidaan saada tavanomaisilla ohjelmilla, joita käytetään epälineaarisen regression laskemiseen, käyttämällä uudelleenparametrisointia (Bruce ja Versteeg, 1992), jolloin matemaattinen kaava kirjoitetaan uudelleen käyttämällä haluttuja piste-estimaatteja, esimerkiksi EC_{10}- ja EC_{50}-arvoa, arvioitavina parametreina. (Funktioksi valitaan I = f (α, β, pitoisuus) ja käytetään määritelmäsuhteita f (α, β, EC_{10}) = 0,1 ja f (α, β, EC_{50}) = 0,5 korvaamaan f (α, β, pitoisuus) vastaavalla funktiolla g (EC_{10}, EC_{50}, pitoisuus).)

Laskenta voidaan tehdä suoraan (Andersen et al, 1998) säilyttämällä alkuperäinen yhtälö ja käyttämällä Taylorin laajennusta r_i:n ja r_0:n keskiarvojen ympäristössä.

Viimeaikoina on käytetty yhä enemmän ”bootstrap”-menetelmiä. Näissä menetelmissä arvioidaan empiiristä varianssijakaumaa käyttämällä mitattuja tietoja ja tiheää uusintanäytteiden ottoa, jota ohjataan satunnaislukugeneraattorilla.

Kirjallisuus

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

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

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

LIITE V

C.25. AEROBINEN MINERALISAATIO PINTAVEDESSÄ – BIOHAJOAVUUDEN SIMULAATIOTESTI

1 MENETELMÄ

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 309 (2004) (1).

1.1 JOHDANTO

Tämän testin tarkoituksena on mitata aerobisessa luonnonvedessä pienenä pitoisuutena olevan testiaineen biohajoavuus ajan funktiona ja kvantifioida havainnot kineettisten nopeuslausekkeiden muodossa. Tämä simulaatiotesti on laboratoriossa panoskokeena (*batch*) suoritettava ravistelutesti, jossa määritetään luonnon pintavesinäytteissä (makea vesi, murtovesi tai merivesi) olevien orgaanisten aineiden aerobisen biohajoavuuden nopeudet. Se perustuu ISO/DIS 14592–1 -testiin (2) ja sisältää myös osia testimenetelmistä C.23 ja C.24 (3)(4). Jos testi on pitkäkestoinen, panosprosessi voidaan korvata puolijatkuvalla prosessilla, jotta estettäisiin testiorganismin huononeminen. Simulaatiotestin ensijaisena tavoitteena on määrittää testiaineen mineralisaatio pintavedessä, ja mineralisaatio muodostaa perustan hajoamiskinetiikan esittämiselle. Toissijaisesti testissä voidaan tutkia primaarista hajoamista ja merkittävien muuntumistuotteiden muodostumista. Muuntumistuotteiden yksilöinti ja mahdollisuuksien mukaan niiden pitoisuuksien määrittäminen on erityisen tärkeää, kun on kyse hitaasti mineralisoituvista aineista (esim. ^{14}C:n kokonaisjäännöksen puoliintumisaikojen ollessa yli 60 päivää). Analyysitekniikoiden rajoitusten vuoksi merkittävien muuntumistuotteiden yksilöinti ja niiden pitoisuuksien määritys edellyttävät tavallisesti testiaineen käyttöä suurempina pitoisuuksina (esim. > 100 µg/l).

Pieni pitoisuus merkitsee tässä testissä pitoisuutta (esim. alle 1 µg/l – 100 µg/l), joka on tarpeeksi alhainen, jotta testin biohajoavuuskinetiikka vastaa ympäristössä ennakoitavaa biohajoavuuskinetiikkaa. Testissä käytetyssä luonnonvedessä olevien biohajoavien hiilisubstraattien kokonaismassaan verrattuna testiaine, joka on pienenä pitoisuutena, on toissijainen substraatti. Tämä merkitsee, että ennakoitu biohajoavuuskinetiikka on ensimmäistä kertalukua (ei kasvua) ja että testiaine voi hajota metabolisten reaktioiden sivuvaikutuksena (cometabolism). Ensimmäisen kertaluvun kinetiikassa hajoamisnopeus (mg/L/päivä) on suhteessa substraatin pitoisuuteen, joka pienenee ajan myötä. Aidossa ensimmäisen kertaluvun kinetiikassa spesifinen hajoamisen nopeusvakio k ei riipu ajasta eikä pitoisuudesta. Toisin sanoen k:n arvo ei vaihtele merkittävästi kokeen aikana eikä muutu lisättäessä pitoisuutta kokeiden välillä. Spesifinen hajoamisen nopeusvakio vastaa pitoisuuden suhteellista muutosta aikayksikköä kohti: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Vaikka kuvatuissa olosuhteissa ennakoidaan ensimmäisen kertaluokan kinetiikkaa, eräät mahdolliset olosuhteet voivat suosia muuntyyppistä kinetiikkaa. Reaktio voi poiketa ensimmäisen kertaluvun kinetiikasta esimerkiksi siinä tapauksessa, jos aineensiirtoon liittyvät ilmiöt, kuten diffuusionopeus (ei biologisen reaktion nopeus) rajoittaa biotransformaation nopeutta. Data voidaan kuitenkin lähes aina kuvata pseudo-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan mukaisesti, jolloin nopeusvakio voi olla pitoisuudesta riippuvainen.

Kokeen suunnittelun ja tulosten tulkinnan tueksi pitäisi etukäteen olla käytettävissä (esim. vakioseulontatesteistä saatavia) tietoja testiaineen biohajoavuudesta suuremmilla pitoisuuksilla sekä tietoja abioottisesta hajoavuudesta, muuntumistuotteista ja relevanteista fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista. ^{14}C-leimalla merkittyjen testiaineiden käyttö ja ^{14}C:n faasijakauman määritys testin lopussa mahdollistavat lopullisen biohajoavuuden määrityksen. Käytettäessä leimaamattomia testiaineita lopullinen biohajoavuus voidaan arvioida vain siinä tapauksessa, että testataan suurempi pitoisuus ja että kaikki pääasialliset muuntumistuotteet tunnetaan.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Primaarinen biohajoaminen: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen rakenteellinen muutos (transformaatio), jonka seurauksena aine menettää kemiallisen rakenteensa.

Funktionaalinen biohajoaminen: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen rakenteellinen muutos (transformaatio), jonka seurauksena aine menettää jonkin erityisen ominaisuuden.

Lopullinen (aerobinen) biohajoaminen: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen hajoaminen hapen vaikutuksesta hiilidioksidiksi, vedeksi ja muiden aineiden kivennäissuoloiksi (mineralisaatio) sekä uuden biomassan ja orgaanisten mikrobiologisten biosynteesituotteiden tuottaminen.

Mineralisaatio: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen tai orgaanisen aineen hajoaminen hapen vaikutuksen vuoksi hiilidioksidiksi, vedeksi ja muiden aineiden kivennäissuoloiksi.

Lag-vaihe: Aika testin alusta siihen, kun hajottavien mikro-organismien adaptaatio on tapahtunut ja kemiallisen aineen tai orgaanisen aineen biohajoamisaste on havaittavalla tasolla (esim. 10 % biohajoamisen teoreettisesta enimmäistasosta tai tätä alempi, riippuen mittaustekniikan tarkkuudesta).

Biohajoamisen enimmäistaso: Kemiallisen aineen tai orgaanisen aineen se prosentteina ilmaistu biohajoamistaso testissä, jonka jälkeen biohajoamista ei enää tapahdu testissä.

Ensisijainen substraatti: Kaikki luonnolliset hiilen ja energian lähteet, joiden ansiosta mikrobibiomassa voi kasvaa ja säilyä.

Toissijainen substraatti: Substraatin osa, joka on niin pienenä pitoisuutena, että sen biohajoamisesta vapautuu vain merkityksettömiä määriä hiiltä ja energiaa kompetenteille mikro-organismeille verrattuna hiileen ja energiaan, jotka vapautuvat pääasiallisten substraatin osien (ensisijaisten substraattien) hajoamisesta.

Hajoamisen nopeusvakio: Ensimmäisen kertaluvun tai pseudo-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan nopeusvakio k (d^{-1}), joka ilmaisee hajoamisprosessien nopeuden. Panoskokeessa k estimoidaan lag-vaihetta seuraavasta hajoamiskäyrän ensimmäisestä osasta.

Puoliintumisaika, $t_{1/2}$ (d): Ensimmäisen kertaluokan reaktion nopeuden kuvaamiseen käytettävä parametri. Se on aikaväli, joka vastaa pitoisuuden vähenemistä puoleen. Puoliintumisajan ja hajoamisen nopeusvakion välinen yhtälö on $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Hajoamisen puoliintumisaika, DT_{50} (d): Biohajoamistestien tuloksen kvantifiointiin käytettävä parametri. Se on aikaväli (mukaan luettuna lag-vaihe), joka tarvitaan 50 prosentin biohajoamisen saavuttamiseen.

Havaitsemisraja (LOD) ja määritysraja (LOQ): Havaitsemisraja (*limit of detection*, LOD) on se aineen pitoisuus, jonka alapuolella ainetta ei voida erottaa määritysartefaktoista. Määritysraja (*limit of quantification*, LOQ) on se aineen pitoisuus, jonka alapuolella pitoisuutta ei voida määritää hyväksyttävällä tarkkuudella.

Liennut orgaaninen hiili (*dissolved organic carbon*, DOC): Se orgaanisen hiilen osa vesinäytteessä, jota ei voida erottaa testiohjeen mukaisella faasierotuksella, esimerkiksi sentrifugioimalla nopeudella 40 000 ms^{-2} 15 minuutin ajan tai kalvosuodatuksella käyttäen kalvoja, joiden huokoskoko on 0,2 µm–0,45 µm.

Orgaanisen ^{14}C:n kokonaisaktiivisuus (*total organic ^{14}C activity*, TOA): Orgaaniseen hiileen liittyvä ^{14}C-kokonaisaktiivisuus.

Liukoisen orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus (*dissolved organic ^{14}C activity*, DOA): Liukoiseen orgaaniseen hiileen liittyvä ^{14}C-kokonaisaktiivisuus.

Partikkelimuodossa olevan orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus (*particulate organic ^{14}C activity*, POA): Partikkelimuodossa olevaan orgaaniseen hiileen liittyvä ^{14}C-kokonaisaktiivisuus.

1.3 TESTIN SOVELLUSALA

Tätä simulaatiotestiä voidaan soveltaa pieninä pitoisuuksina testattaviin haihtumattomiin tai lievästi haihtuviin orgaanisiin aineisiin. Käytettäessä pulloja, joita ei ole suljettu ilmalta (esim. vanutupoilla suljettuja pulloja), käytännössä haihtumattomina voidaan pitää aineita, joiden Henryn lain vakio on alle noin 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (arviolta 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$). Käytettäessä suljettuja pulloja, joissa on vapaa ilmatila, voidaan testata lievästi haihtuvia aineita (joiden Henryn lain vakio on < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ tai < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) ilman vuotoja testijärjestelmästä. ^{14}C-leimattuja aineita voidaan menettää CO_2:n poiston yhteydessä, jos tarvittaviin varokeinoihin ei ryhdytä. Tällaisissa tilanteissa voi olla tarpeen imeyttää CO_2 absorboivaan emäksiseen aineeseen testijärjestelmän sisällä tai käyttää ulkoista CO_2-absorbointijärjestelmää (suora $^{14}CO_2$:n määritys; ks. liite 3). Biohajoavuuskinetiikan määrittämiseksi testiaineen pitoisuuden on oltava sen vesiliukoisuusrajan alapuolella. On huomattava, että lähdekirjallisuudesta saadut vesiliukoisuuden arvot voivat olla merkittävästi suurempia kuin testiaineen liukoisuus luonnonvedessä. Erityisen huonosti veteen liukenevien testiaineiden liukoisuus voidaan määrittää myös käyttämällä testattavaa luonnonvettä.

Menetelmää voidaan käyttää biohajoavuuden simulointiin pintavedesssä, jossa ei ole karkeita hiukkasia ("pelaginen testi"), tai sameassa pintavedessä esimerkiksi lähellä veden ja sedimentin rajapintaa ("suspendoituneen sedimentin testi").

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testi suoritetaan panoskokeena (*batch*) inkuboimalla testiainetta joko pelkästään pintavedellä (pelaginen testi) tai pintavedellä, jossa on suspendoitunutta kiintoainesta tai sedimenttiä kuiva-aineena 0,01–1 g/L (suspendoituneen sedimentin testi). Tällä tavoin testillä simuloidaan vesistöä, jossa on suspendoitunutta kiintoainesta tai uudelleen suspendoitunutta sedimenttiä. Useimmissa pintavesissä suspendoitunut kiintoaines tai sedimetti on tyypillisesti pitoisuuksina, jotka sijoittuvat mainitun asteikon alapäähän. Testipulloja inkuboidaan pimeässä ympäristön lämpötilassa aerobisissa olosuhteissa ja jatkuvasti sekoittaen. Ainakin kahta testiaineen pitoisuutta tulisi käyttää, jotta hajoavuuskinetiikka voidaan määrittää. Pitoisuuksien välillä tulisi olla 5–10-kertainen ero, ja niiden tulisi edustaa pitoisuuksia, joiden odotetaan vallitsevan ympäristössä. Testiaineen enimmäispitoisuus ei saisi olla yli 100 µg/L. Suosituksena on kuitenkin, että se on alle 10 µg/L. Näin varmistetaan, että biohajoavuus noudattaa ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa. Vähimmäispitoisuus ei saisi olla yli 10 µg/L, mutta suosituksena on, että se on 1–2 µg/L tai alle 1 µg/L. Näin pieni pitoisuus mahdollistaa normaalisti riittävän analyysin käytettäessä kaupallisesti saatavilla olevia ^{14}C-leimattuja aineita. Analyysimenetelmien rajoitusten vuoksi testiaineen pitoisuutta on usein mahdoton mitata vaadittavalla tarkkuudella, jos annosteltu testiaineen pitoisuus ≤ 100 µg/L (ks. kohta 1.7.2, toinen kappale). Suurempia testiaineen pitoisuuksia (> 100 µg/L ja joskus > 1 mg/L) voidaan käyttää merkittävien muuntumistuotteiden yksilöintiin ja niiden pitoisuuksien määritykseen tai jos käytettävissä ei ole analyysimenetelmää, jonka havaitsemisraja on tarpeeksi alhainen. Jos testiainetta testataan suurina pitoisuuksina, tuloksia ei ehkä ole mahdollista käyttää ensimmäisen kertaluvun vakion ja puoliintumisajan estimointiin, koska hajoaminen ei todennäköisesti seuraa ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa.

Hajoamista seurataan sopivin aikavälein mittaamalla joko jäännös-^{14}C tai testiaineen jäännöspitoisuus (jos käytetään erityistä kemiallista analyysia). ^{14}C-leima molekyylin stabiileimmassa osassa varmistaa sen, että koko mineralisaatio voidaan määrittää. Jos ^{14}C-leima on vähemmän stabiilissa molekyylin osassa tai jos käytetään erityistä kemiallista analyysia, voidaan arvioida vain primaarinen biohajoaminen. Stabiilein osa ei kuitenkaan välttämättä sisällä molekyylin toiminnan kannalta relevanttia osaa (joka voidaan kytkeä erityiseen ominaisuuteen, kuten toksisuuteen, bioakkumulaatioon jne.). Tällöin voi olla tarkoituksenmukaista käyttää ^{14}C-leimattua testiainetta kyseisessä toiminnan kannalta relevantissa osassa, jos on määrä seurata erityisen ominaisuuden eliminaatiota.

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Sekä radioaktiivisella merkkiaineella leimattuja että leimaamattomia testiaineita voidaan käyttää tässä testissä. ^{14}C on suositeltava leima, ja sen pitäisi tavallisesti sijaita molekyylin stabiileimmassa osassa tai osissa (ks. myös kohta 1.4). Jos on kyse aineista, joissa on useampi kuin yksi aromaattinen rengas, on suositeltavaa, että yksi tai useampi hiili kussakin renkaassa varustetaan ^{14}C-leimalla. Lisäksi suositellaan, että helposti hajoavien liitosten kummallakin puolella yksi tai useampi hiili varustetaan ^{14}C-leimalla. Testiaineen kemiallisen ja/tai radiokemiallisen puhtauden tulisi olla > 95 %. Kun on kyse radioaktiivisella merkkiaineella merkityistä aineista, suositeltava spesifinen aktiivisuus on noin 50 µCi/mg (1,85 MBq) tai tämän yli, jotta helpotettaisiin ^{14}C-mittauksia pienillä lähtöpitoisuuksilla tehtävissä testeissä. Testiaineesta tulisi olla käytettävissä seuraavat tiedot:

— vesiliukoisuus [testimenetelmä A.6],

— liukoisuus orgaanisiin liuottimiin (liuottimella käsitellyt aineet tai huonosti veteen liukenevat aineet),

— dissosiaatiovakio (pKa), jos aine protonoituu tai deprotonoituu [OECD TG 112] (5),

— höyrynpaine [testimenetelmä A.4] ja Henryn lain vakio,

— kemiallinen stabiilius vedessä ja pimeässä (hydrolyysi) [testimenetelmä C.7].

Testattaessa huonosti veteen liukenevia aineita merivedessä voi olla hyödyllistä tietää myös ulossuolautumisvakio (Setschenowin vakio) K^s, joka voidaan määrittää seuraavasta lausekkeesta: log (S/S") = K^s C_m, missä S on aineen liukenevuus makeassa vedessä ja S" aineen liukenevuus merivedessä ja C_m molaarinen suolapitoisuus.

Jos testi suoritetaan "suspendoituneen sedimentin testinä", myös seuraavien tietojen tulisi olla käytettävissä:

— n-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin [testimenetelmä A.8],

— adsorptiokerroin [testimenetelmä C.18].

Myös seuraavat tiedot voivat olla hyödyllisiä:

— ympäristöpitoisuus, jos se tiedetään tai on estimoitu,

— testiaineen toksisuus mikro-organismeille [testimenetelmä C.11],

— nopea biohajoavuus (*ready biodegradability*) ja/tai aineen luontainen biohajoavuus (*inherent biodegradability*) [testimenetelmät C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)],

— aerobinen tai anaerobinen biohajoavuus maassa sekä muuntumistutkimusten tulokset (sedimentti/vesi) [menetelmät C.23, C.24].

1.6 VERTAILUAINE

Vertailuaineena tulisi käyttää ainetta, joka on helposti hajoava aerobisissa olosuhteissa (esim. aniliini tai natriumbentsoaatti). Aniliinin ja natriumbentsoaatin odotettu hajoamisaika on yleensä alle 2 viikkoa. Vertailuaineiden tarkoituksena on varmistaa, että testiveden mikrobiologinen aktiviteetti on tietyissä rajoissa, ts. että vedessä on aktiivinen mikrobipopulaatio.

1.7 LAATUKRITEERIT

1.7.1 **Saanto**

Kukin alkuperäinen testipitoisuus tulisi välittömästi testiaineen lisäämisen jälkeen tarkistaa mittaamalla ^{14}C-aktiviteetti tai (jos on kyse testiaineesta, jota ei ole leimattu merkkiaineella) kemiallisella analyysilla vähintään kahdessa näytteessä. Tämä tarjoaa tietoa analyysimenetelmän sovellettavuudesta ja toistettavuudesta ja testiaineen jakauman tasaisuudesta. Tavallisesti myöhemmissä tulosten analyyseissä käytetään alussa mitattua ^{14}C-aktiivisuutta tai testiaineen pitoisuutta eikä nimellispitoisuutta, koska tällä tavoin voidaan ottaa huomioon sorptiosta ja annosteluvirheistä johtuvat häviöt. ^{14}C-leimatun testiaineen osalta saanto testin lopussa ilmoitetaan massataseena (ks. kohta 1.8.9.4, viimeinen kappale). Ihannetapauksessa massataseen tulisi radioaktiivisella merkkiaineella leimattuja aineita käytettäessä olla 90–110 %, ja analyyttisen tarkkuuden tulisi olla sellainen, että merkitsemättömien testiaineiden alkuperäiseksi saannoksi testin alussa saadaan 70–110 %. Näitä vaihteluvälejä tulisi pitää tavoitteina eikä perusteina testin hyväksynnälle. Vaihtoehtoisesti analyyttinen tarkkuus voidaan määrittää testiaineelle alkuperäistä pitoisuutta pienemmällä pitoisuudella sekä merkittäville muuntumistuotteille.

1.7.2 **Analyysimenetelmän toistettavuus ja herkkyys**

Analyysimenetelmän toistettavuus (mukaan luettuna alussa tehtävän uuton tehokkuus) testiaineen ja tapauksen mukaan muuntumistuotteiden kvantifioimiseksi tulisi tarkistaa viidellä rinnakkaisella analyysilla pintaveden yksittäisistä uutteista.

Analyysimenetelmän havaitsemisrajan (LOD) tulisi testiaineen ja muuntumistuotteiden osalta olla mahdollisuuksien mukaan ainakin 1 % testijärjestelmään annostellusta alkuperäisestä määrästä. Määritysrajan (LOQ) tulisi olla 10 % annostellusta pitoisuudesta tai tätä alempi. Monien orgaanisten aineiden ja niiden muuntumistuotteiden kemialliset analyysit edellyttävät usein, että testiaine annostellaan suhteellisen suurina pitoisuuksina (> 100 µg/L).

1.8 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Laitteet**

Testi voidaan tehdä sopivan suuruisissa (esim. 0,5 tai 1,0 litran) erlenmeyerpulloissa tai sylinteripulloissa, jotka on suljettu silikoni- tai kumitulpilla, tai seerumipulloissa, joissa on hiidioksidia läpäisemättömät kannet (esim. butyylikumikalvo). Toisena vaihtoehtona on suorittaa testi useilla pulloilla ja ottaa niiden joukosta kunakin näytteenottoajankohtana näytteeksi vähintään kahden pullon sisältö (ks. kohta 1.8.9.1, viimeinen kappale). Jos testiaineet ovat haihtumattomia eikä niitä ole leimattu radioaktiivisella merkkiaineella, kaasutiiviitä tulppia tai kansia ei vaadita; väljät puuvillatupot, jotka estävät kontaminaation ympäröivästä ilmasta, riittävät (ks. kohta 1.8.9.1, toinen kappale). Lievästi haihtuvat aineet tulisi testata biometer-tyyppisessä järjestelmässä, jossa veden pintaa sekoitetaan kevyesti.

Bakteerikontaminaation estämiseksi astiat voidaan vaihtoehtoisesti sterilisoida kuumentamalla tai autoklaavikäsittelyllä ennen käyttöä. Lisäksi käytetään seuraavia tavanomaisia laboratoriolaitteita:

— ravistin tai magneettisekoittimet testipullojen jatkuvaa sekoittamista varten,

— sentrifugi,

— pH-mittari,

— sameusmittari sameuden nefelometristä määritystä varten,

— uuni tai mikroaaltouuni kuiva-ainemäärityksiä varten,

— kalvosuodatin,

— autoklaavi tai uuni lasiastioiden sterilointia varten,

— laitteet ^{14}C-leimattujen aineiden käsittelyyn,

— laitteet, joilla kvantifioidaan ^{14}C-aktiivisuus CO_2:n imeytysliuoksista otetuissa näytteissä ja tarvittaessa sedimenttinäytteissä,

— analyysilaitteet testiaineen (ja vertailuaineen) määritystä varten, jos käytetään erityistä kemiallista analyysia (esim. kaasukromatografi tai korkean paineen nestekromatografi).

1.8.2 **Testiaineen varastoliuokset**

Testi- ja vertailuaineen varastoliuosten valmistamiseen käytetään deionisoitua vettä (ks. kohta 1.8.7, ensimmäinen kappale). Deionisoidussa vedessä ei saa olla aineita, jotka voivat olla toksisia mikro-organismeille, eikä liukoista orgaanista hiiltä (DOC) yli 1 mg/L (6).

1.8.3 **Pintaveden otto ja kuljetus**

Pintaveden näytteenottopaikka tulisi valita siten, että se vastaa testin tarkoitusta. Näytteenottopaikkojen valinnassa on otettava huomioon mahdollinen maanviljelyn, teollisuuden ja kotitalouksien vaikutus. Jos tiedetään, että vesiympäristö on kontaminoitunut testiaineen tai sitä rakenteeltaan vastaavien aineiden vaikutuksesta edellisten neljän vuoden aikana, sitä ei pitäisi käyttää testiveden ottoon, jollei nimenomaisena tarkoituksena ole tutkia hajoamisnopeuksia jo altistuneissa kohteissa. Veden pH-arvo ja lämpötila tulisi mitata näytteenottopaikassa. Lisäksi tulisi kirjata näytteenottosyvyys ja vesinäytteen ulkonäkö (esim. väri ja sameus). Happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali (redoxpotentiaali) vedessä ja sedimentin pintakerroksessa mitataan aerobisten ominaisuuksien osoittamiseksi, elleivät ne käy selville vesinäytteen ulkonäöstä ja kohteessa aiemmin saaduista kokemuksista. Pintavesi tulisi kuljettaa täysin puhdistetussa astiassa. Kuljetuksen aikana näytteen lämpötila ei saa merkittävästi ylittää testissä käytettävää lämpötilaa. Viilentäminen 4 °C:seen on suositeltavaa, jos kuljetuksen kesto on yli 2–3 tuntia. Vesinäyte ei saa jäätyä.

1.8.4 **Pintaveden säilytys ja valmistelu**

Testi on suositeltavaa aloittaa yhden päivän kuluessa näytteenotosta. Jos vettä joudutaan säilyttämään, säilytysaika on minimoitava, eikä se saa missään tapauksessa ylittää neljää viikkoa. Vesinäytettä olisi pidettävä 4 °C:ssa ilmastettuna sen käyttöön saakka. Karkeat hiukkaset poistetaan ennen käyttöä esimerkiksi suodattamalla nailonsuodattimen (aukkokoko noin 100 µm) tai karkean paperisuodattimen läpi tai sedimentoimalla.

1.8.5 **Sellaisen vesinäytteen valmistelu, johon on lisätty sedimenttiä (vaihtoehtoinen)**

Suspendoituneen sedimentin testissä pintasedimenttiä lisätään luonnonveden (joka on suodatettu karkeiden hiukkasten poistamiseksi kohdassa 1.8.4 kuvatulla tavalla) sisältäviin pulloihin suspension aikaansaamiseksi. Suspendoituneen kiintoaineksen pitoisuuden pitäisi olla 0,01–1 g/L. Pintasedimentin tulisi olla samasta kohteesta, josta vesinäyte otettiin. Kulloisestakin vesiympäristöstä riippuen pintasedimentille voi olla ominaista joko suuri orgaanisen hiilen määrä (2,5–7,5 %) ja hienojakoisuus tai matala orgaanisen hiilen määrä (0,5–2,5 %) ja karkeajakoisuus (3). Pintasedimentti voidaan valmistaa seuraavasti: sedimentistä otetaan useita kairausnäytteitä käyttäen

läpinäkyvää muoviputkea, ja ylemmät aerobiset kerrokset (pinnasta enintään 5 mm:n syvyyteen) leikataan pois välittömästi näytteenoton jälkeen ja yhdistetään. Näin saatava sedimenttinäyte kuljetetaan säiliössä, jossa on laaja vapaa ilmatila, jotta sedimentti pysyisi aerobisissa olosuhteissa (näyte on viilennettävä 4 °C:seen, jos kuljetus kestää yli 2–3 tuntia). Sedimenttinäyte suspendoidaan testiveteen suhteessa 1:10 ja pidetään 4 °C:ssa ilmastettuna aina käyttöön saakka. Jos sedimenttiä joudutaan säilyttämään, säilytysaika on minimoitava, eikä se saa missään tapauksessa ylittää neljää viikkoa.

1.8.6 **Puolijatkuva menettely (vaihtoehtoinen)**

Pitkä inkuboimisaika (useita kuukausia) voi olla tarpeen, jos lag-vaihe kestää pitkään ennen kuin merkittävää testiaineen hajoamista voidaan mitata. Jos tämä tiedetään jo aikaisempien testien perusteella, testissä voidaan alusta lähtien käyttää puolijatkuvaa menettelyä, jossa osa testivedestä tai suspensiosta korvataan määräajoin uudella vedellä. Vaihtoehtoisesti normaali panoskoe (*batch*) voidaan muuttaa testin aikana puolijatkuvaksi testiksi, jos testiaineen hajoamista ei ole tapahtunut noin 60 päivän kuluessa panostestimenettelyä käyttäen (ks. kohta 1.8.8.3, toinen kappale).

1.8.7 **Testiaineen (tai vertailuaineen) lisääminen**

Jos aineen vesiliukoisuus on suuri (> 1 mg/L) ja haihtuvuus pieni (Henryn lain vakio < 1 Pa·m^3/mol tai < 10^{-5} atm·m^3/mol), varastoliuos voidaan valmistaa deionisoituun veteen (ks. kohta 1.8.2), minkä jälkeen sopiva määrä varastoliuosta lisätään testiastioihin, kunnes haluttu pitoisuus on saavutettu. Lisätyn varastoliuoksen määrä tulisi pitää mahdollisimman pienenä (mahdollisuuksien mukaan < 10 % lopullisesta nestevolyymista). Toisena mahdollisuutena on liuottaa testiaine suurempana volyyminä testiveteen; tätä voidaan pitää vaihtoehtona orgaanisten liuottimien käytölle.

Jos muuta mahdollisuutta ei ole, haihtumattomien ja heikosti veteen liukenevien aineiden varastoliuokset tulisi valmistaa käyttämällä haihtuvaa orgaanista liuotinta, mutta testijärjestelmään lisätyn liuottimen määrä ei saisi ylittää 1 % (v/v) eikä vaikuttaa haitallisesti mikrobiologiseen aktiivisuuteen. Liuotin ei saa vaikuttaa testiaineen stabiiliuteen vedessä. Liuotin tulisi poistaa, kunnes sitä on jäljellä äärimmäisen pieni määrä, jottei se lisäisi merkittävästi testiveden tai suspension DOC-pitoisuutta. Tämä tulisi tarkistaa ainekohtaisella analyysillä tai DOC-analyysilla, jos se on mahdollista (6). Huolehdittaessa siitä, että lisätyn liuottimen määrä rajoitetaan välttämättömään, on samalla varmistettava, että testiainemäärä voi liueta lopullisessa testiveden määrässä. Myös muita tapoja annostella testiaine testiastioihin voidaan käyttää (ks. (7) ja (8)). Jos testiaineen annostelussa käytetään orgaanista liuotinta, liuotinkontrolleja, jotka sisältävät pelkästään testivettä (ilman lisättyjä aineita) sekä testivettä, johon on lisätty vertailuaine, on käsiteltävä samalla tavoin kuin aktiivisia testiastioita, joissa on testiaine kantoaineenaan liuotin. Liuotinkontrollien tarkoituksena on tutkia liuottimen mikrobipopulaatiolle mahdollisesti aiheuttamia haitallisia vaikutuksia vertailuaineen hajoamisen perusteella.

1.8.8 **Testiolosuhteet**

1.8.8.1 *Testilämpötila*

Inkubaation tulisi tapahtua pimeässä (suositeltava vaihtoehto) tai heikossa valossa säädellyssä (± 2 °C) lämpötilassa, joka voi olla ympäristön lämpötila tai 20–25 °C:n vakiolämpötila. Ympäristön lämpötila voi olla joko näytteen oma lämpötila näytteenottoajankohtana tai ympäristön keskilämpötila näytteenottopaikassa.

1.8.8.2 *Sekoittaminen*

Testipulloja sekoitetaan ravistelemalla tai hämmentämällä niitä jatkuvasti, jotta hiukkaset ja mikro-organismit pysyisivät suspendoituneina. Sekoittaminen myös auttaa hapen siirtymistä avoimesta ilmatilasta nesteeseen, niin että voidaan ylläpitää riittäviä aerobisia olosuhteita. Testipullot asetetaan ravistimeen (noin 100 rpm), tai niitä sekoitetaan magneettisekoittimella. Sekoittamisen on oltava jatkuvaa. Ravistelun tai hämmentämisen on kuitenkin oltava mahdollisimman varovaista siten, että suspensio juuri ja juuri pysyy homogeenisena.

1.8.8.3 *Testin kesto*

Testi ei saisi tavallisesti kestää yli 60 päivää, jollei käytetä puolijatkuvaa prosessia, jossa testisuspensiota korvataan määrävälein uudella (ks. kohta 1.8.6 ja liite 2). Testin kesto panoskokeessa voidaan kuitenkin pidentää enimmillään 90 päivään, jos testiaineen hajoaminen on alkanut ensimmäisten 60 päivän aikana. Hajoamista seurataan sopivin aikavälein määrittämällä ^{14}C-jäännösaktiivisuus tai muodostunut $^{14}CO_2$ (ks. kohta 1.8.9.4) ja/tai kemiallisella analyysilla (kohta 1.8.9.5). Inkubaatioajan on oltava riittävän pitkä, jotta hajoamisprosessi voidaan arvioida. On suositeltavaa, että hajoamisen laajuus on yli 50 %. Hitaasti hajoavien aineiden osalta hajoamisen laajuuden on oltava riittävä (tavallisesti yli 20 %), jotta hajoamiskinetiikan nopeusvakio voidaan estimoida.

Happipitoisuus ja pH on mitattava testijärjestelmässä määrävälein, jolleivät nämä mittaukset ole tarpeettomia samasta kohteesta otetuilla vesi- ja sedimenttinäytteillä tehdyistä vastaavista testeistä saadun kokemuksen perusteella. Vedessä tai sedimentissä paljon suurempina pitoisuuksina olevien ensisijaisten substraattien metabolismi saattaa joissain olosuhteissa johtaa CO_2:n muodostumiseen ja hapen häviämiseen siinä määrin, että se muuttaa merkittävästi koeolosuhteita testin aikana.

1.8.9 **Menettely**

1.8.9.1 *Testipullojen valmistelu pelagiseen testiin*

Sopiva määrä testivettä siirretään testipulloihin, enintään noin kolmasosa pullon volyymistä ja vähintään noin 100 ml. Jos käytetään useita pulloja (joiden joukosta otetaan näytteeksi kokonaisten pullojen sisältö kunakin näytteenottoajankohtana), sopiva testiveden määrä on niin ikään noin 100 ml, koska pienet näytemäärät voivat vaikuttaa lag-vaiheen pituuteen. Testiaine lisätään varastoliuoksesta kohdissa 1.8.2 ja 1.8.7 kuvatulla tavalla. Ainakin kahta eri testiaineen pitoisuutta, jotka poikkeavat toisistaan 5–10-kertaisesti, tulisi käyttää hajoamiskinetiikan määrittämiseksi ja sen nopeusvakion laskemiseksi. Kummakin valitun pitoisuuden pitäisi olla alle 100 µg/L ja mieluiten välillä < 1–10 µg/L.

Testipullot suljetaan ilma- ja CO_2-tiiviillä tulpilla tai kansilla. Haihtumattomille testikemikaaleille, joita ei ole merkitty ^{14}C-leimalla, soveltuvat väljät vanutupot, jotka estävät kontaminaation ilmasta (ks. kohta 1.8.1). Edellytyksenä on kuitenkin, että mahdollisten merkittävien hajoamistuotteiden tiedetään olevan hajoamattomia ja että käytetään epäsuoraa CO_2-pitoisuuden määritystä (ks. liite 3).

Testipulloja inkuboidaan valitussa lämpötilassa (ks. kohta 1.8.8.1). Testin alussa (ennen biohajoamisen alkamista, ks. kohta 1.7.1) otetaan näytteitä kemiallista analyysia tai ^{14}C-mittauksia varten ja sen jälkeen sopivin välein testin aikana. Näytteenotto voidaan suorittaa ottamalla osanäyte (esim. 5 ml) kustakin rinnakkaisesta näytteestä tai ottamalla näytteeksi kokonaisia testipulloja kunakin näytteenottoajankohtana. Testiaineen mineralisaatio voidaan määrittää joko epäsuorana tai suorana määrityksenä (ks. liite 3). Hajoamisvaiheen aikana (eli lag-vaiheen päätyttyä) tarvitaan tavallisesti vähintään viisi näytteenottoa, jotta nopeusvakio voidaan estimoida luotettavasti, jollei voida perustella, että kolme näytteenottoa riittää nopeasti hajoaville aineille. Jos aine ei ole nopeasti hajoava, hajoamisvaiheen aikana voidaan helposti tehdä lisää mittauksia, jolloin k:n estimointiin käytetään enemmän datapisteitä. Näytteenottoa varten ei voida vahvistaa aikaväliä, koska biohajoamisen nopeus vaihtelee. Suosituksena on kuitenkin, että näyte otetaan kerran viikossa, jos hajoaminen on hidasta. Jos testiaine on nopeasti hajoava, näytteenoton tulisi tapahtua kerran päivässä ensimmäisten kolmen päivän aikana ja sen jälkeen joka toinen tai kolmas päivä. Joissain olosuhteissa, esimerkiksi hyvin nopeasti hydrolisoituvien aineiden tapauksessa, voi olla tarpeen ottaa näytteet tunnin välein. Ennen testiä on suositeltavaa tehdä esitutkimus sopivan näytteenottovälin määrittämiseksi. Jos käytettävissä on oltava näytteitä myöhempiä erityisiä analyyseja varten, näytteitä otetaan enemmän ja analysoitavat näytteet valitaan kokeen lopussa vastakkaisessa järjestyksessä siten, että viimeiset näytteet analysoidaan ensin (näytteiden stabiiliudesta varastoinnin aikana ks. kohta 1.8.9.5, toinen kappale).

1.8.9.2 *Testipullojen ja näytteiden lukumäärä*

Testipulloja tarvitaan seuraavasti:

— testipullot: ainakin kaksi testipulloa kutakin testiaineen pitoisuutta varten (suositeltava määrä on vähintään kolme) tai useampia testipulloja kutakin pitoisuutta kohti, jos kunakin näytteenottoajankohtana otetaan otetaan näytteeksi kokonaisia pulloja (lyhenne F_T),

— testipullot massataseen laskemista varten: ainakin kaksi testipulloa kutakin pitoisuutta kohti (lyhenne F_M),

— nollanäyte ilman testiainetta: ainakin yksi taustanäytepullo, joka sisältää pelkästään testivettä (lyhenne F_B),

— vertailukontrolli: kaksi testipulloa, joissa on vertailuaine (esim. aniliini tai natriumbentsoaattia 10 µg/l) (lyhenne F_C). Vertailukontrollin tarkoituksena on vahvistaa tietyn mikrobiologisen aktiviteetin olemassaolo. Radioaktiivista vertailuainetta voidaan käyttää, jos se on käytännöllistä, myös siinä tapauksessa, että testiaineen hajoamista seurataan kemiallisella analyysilla,

— steriili kontrolli: yksi tai kaksi testipulloa, jotka sisältävät steriloitua testivettä, jotta voidaan tutkia mahdollista abioottista hajoamista tai muuta testiaineen ei-biologista häviämistä (lyhenne F_S). Biologinen aktiivisuus voidaan lopettaa testiveden autoklaavikäsittelyllä (20 min 121 °C:ssa) tai lisäämällä myrkyllistä ainetta (esim. natriumatsidia (NaN_3) 10–20 g/l, elohopeakloridia ($HgCl_2$) 100 mg/l tai formaliinia 100 mg/l) tai gammasäteilytyksellä. Käytettäessä $HgCl_2$:a siitä tulisi huolehtia myrkyllisenä jätteenä. Steriilien olosuhteiden luominen veteen ei ole helppoa, jos se sisältää sedimenttiä suurina määrinä. Tässä tapauksessa suositellaan autoklaavikäsittelyn toistamista (esim. suorittamalla se kolmesti). Tällöin tulisi ottaa huomioon, että sedimentin sorptio-ominaisuudet voivat muuttua autoklaavikäsittelyn vuoksi,

— liuotinkontrollit, jotka sisältävät pelkästään testivettä sekä testivettä, johon on lisätty vertailuaine; kutakin kontrollia kohti kaksi testipulloa, jotka sisältävät saman määrän liuotinta ja joita käsitellään samalla tavoin kuin testiaineen annostelemisessa. Tarkoituksena on tutkia mahdollisia liuoksen haitallisia vaikutuksia määrittämällä vertailuaineen hajoaminen.

Testiä suunniteltaessa tulisi ottaa huomioon, miten testien määrän lisääminen vaikuttaa näytteenottoajankohtien määrään. Tarvittavien testipullojen tarkka määrä riippuu hajoamisen laskentaan käytetystä menetelmästä (ks. kohta 1.8.9.1, kolmas kappale; kohta 1.8.9.4 ja liite 3).

Kustakin testipullosta tulisi ottaa kaksi osanäytettä (esim. 5 ml) kunakin näytteenottoajankohtana. Jos käytetään useampia pulloja, joiden joukosta otetaan näytteet kokonaisten pullojen sisältöinä, vähintään kahden testipullon sisältö tulisi ottaa näytteeksi kunakin näytteenottoajankohtana (ks. kohta 1.8.9.1, ensimmäinen kappale).

1.8.9.3 *Testipullojen valmistelu suspendoituneen sedimentin testiä varten [vaihtoehtoinen]*

Tarvittavat määrät testivettä ja (tarvittaessa) sedimenttiä lisätään testipulloihin (ks. kohta 1.8.5). Testipullot valmistellaan suspendoituneen sedimentin testiä varten samalla tavoin kuin pelagista testiä varten (ks. kohdat 1.8.9.1 ja 1.8.9.2). Suosituksena on käyttää seerumipulloja tai niiden muotoisia testipulloja. Suljetut testipullot asetetaan ravistimeen vaaka-asentoon. ^{14}C-leimalla varustamattomia haihtumattomia aineita sisältävät avoimet testipullot asetetaan pystyasentoon. Tässä tapauksessa suositellaan sekoitusta magneettisekoittimella, jossa käytetään lasipinnoitteisia magneettisauvoja. Tarvittaessa testipulloja on ilmastettava aerobisten olosuhteiden ylläpitämiseksi.

1.8.9.4 *Radiokemialliset määritykset*

Muodostunut $^{14}CO_2$ mitataan epäsuorana ja suorana määrityksenä (ks. liite 3). $^{14}CO_2$:n epäsuora määritys tapahtuu määrittämällä testissä käytetyn veden tai suspension alkuperäisen ^{14}C-aktiivisuuden ja näytteenottoajankohtana mitatun jäännösaktiivisuuden kokonaismäärän välinen erotus sen jälkeen, kun näyte on happamoitettu pH-arvoon 2–3 ja CO_2 poistettu. Koska epäorgaaninen hiili poistetaan, mitattu jäännösaktiivisuus on peräisin orgaanisesta materiaalista. Epäsuoraa $^{14}CO_2$:n määritystä ei tulisi käyttää, jos testiaineen muuntumisen aikana muodostuu merkittäviä haihtuvia muuntumistuotteita (ks. liite 3). $^{14}CO_2$:n muodostuminen tulisi mahdollisuuksien mukaan mitata suorana määrityksenä (ks. liite 3) kunakin näytteenottoajankohtana vähintään yhdessä testipullossa. Tällä menettelyllä voidaan tarkistaa sekä massatase että biohajoamisprosessi, mutta sitä voidaan käyttää vain suljetuilla testipulloilla tehtävissä testeissä.

Jo muodostunut $^{14}CO_2$ mitataan suorana määrityksenä testin aikana, tätä varten tulisi varata enemmän testipulloja testin alussa. Suoraa $^{14}CO_2$:n määritystä suositellaan, jos testiaineen muuntumisen aikana muodostuu merkittäviä haihtuvia muuntumistuotteita. Lisätestipullot happamoitetaan kunakin näytteenottoajankohtana pH-arvoon 2–3 ja $^{14}CO_2$ erotetaan sisäiseen tai ulkoiseen imeyttimeen (ks. liite 3).

^{14}C-leimatun testiaineen ja merkittävien muuntumistuotteiden pitoisuudet voidaan vaitoehtoisesti määrittää käyttämällä radiokromatografiaa (esim. RAD-TLC-ohutkerroskromatografiaa) tai HPLC:tä radiokemiallisella detektiolla.

Vaihtoehtoisesti voidaan määrittää jäljellä olevan radioaktiivisuuden faasijakauma (ks. liite 1) ja jäljellä oleva testiaine ja muuntumistuotteet.

Testin lopussa massatase tulisi määrittää suoralla $^{14}CO_2$:n mittauksella käyttäen erillisiä testipulloja, joista ei ole otettu näytteitä testin aikana (ks. liite 3).

1.8.9.5 *Erityinen kemiallinen analyysi*

Jos käytettävissä on herkkä erityinen analyysimenetelmä, primaarinen biohajoaminen voidaan arvioida mittaamalla testiaineen kokonaisjäännöspitoisuus sen sijaan, että käytettäisiin radioaktiivisia merkkiaineita. Käytettäessä radioaktiivisella merkkiaineella leimattua testiainetta (kokonaismineralisaation mittaamiseksi) erityisiä kemiallisia analyyseja voidaan tehdä samanaikaisesti, sillä niiden avulla voidaan saada hyödyllisiä lisätietoja ja arvioida menettelyä. Erityistä kemiallista analyysia voidaan myös käyttää testiaineen hajoamisen aikana syntyneiden muuntumistuotteiden mittaamiseksi, ja tätä suositellaan aineille, joiden mineraalisaatio tapahtuu yli 60 päivän puoliintumisajoin. Testiaineen pitoisuus ja muuntumistuotteet kunakin näytteenottoajankohtana tulisi mitata ja kirjata testiselosteeseen (pitoisuutena ja prosenttiosuutena). Yleisesti muuntumistuotteet, joiden prosenttiosuuden todetaan olevan ≥ 10 % annostellusta pitoisuudesta minä tahansa näytteenottoajankohtana, olisi yksilöitävä, ellei ole perusteltua jättää tätä tekemättä. Lisäksi on harkittava sellaisten muuntumistuotteiden yksilöimistä, joiden pitoisuudet kasvavat jatkuvasti testin aikana, vaikka niiden pitoisuudet eivät ylittäisi edellä mainittua rajaa, sillä pitoisuuden jatkuva kasvu voi olla merkkinä pysyvyydestä. Muuntumistuotteiden analyysia steriileissä kontrolleissa olisi harkittava, jos testiaineen nopean abioottisen muuntumisen (esim. hydrolyysin) katsotaan olevan mahdollista. Muuntumistuotteiden kvantifioinnin ja yksilöinnin tarvetta tulisi harkita tapauskohtaisesti, ja se tulisi perustella testiselosteessa. Uuttomenetelmiä, joissa käytetään orgaanista liuotinta, tulisi soveltaa kyseistä analyysimenetelmää varten annettuja ohjeita noudattaen.

Kaikki näytteet varastoidaan ilmatiiviisti 2–4 °C:n lämpötilassa, jos analyysi tehdään 24 tunnin sisällä (suositeltava vaihtoehto). Tätä pitempää säilytystä varten näytteet olisi jäädytettävä alle –18 °C:seen tai säilöttävä kemiallisesti. Happamoittaminen ei ole suositeltava keino näytteiden säilömiseksi, koska happamoitetut näytteet voivat olla epästabiileja. Jos näytteitä ei analysoida 24 tunnin kuluessa ja niitä säilytetään pitempään, olisi tehtävä tutkimus niiden stabiiliudesta varastoinnin aikana, jotta voidaan osoittaa kyseisten kemikaalien stabiilius alle –18 °C:n lämpötilassa tai säilöntäoloissa. Jos analyysimenetelmä edellyttää joko liuotinuuttoa tai kiinteäfaasiuuttoa (SPE), uutto tulisi tehdä välittömästi näytteenoton jälkeen tai enintään 24 tunnin kylmävarastoinnin jälkeen.

Analyysimenetelmän herkkyydestä riippuen voidaan tarvita suurempia näytemääriä kuin 1.8.1 kohdassa mainitaan. Testi voidaan helposti suorittaa yhden litran testivolyymeilla 2–3 litran testipulloissa, jolloin voidaan ottaa noin 100 ml:n suuruisia näytteitä.

2. TULOKSET JA TESTISELOSTE

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

2.1.1 **Tulosten graafinen esitys**

Näytteenottoajat pyöristetään tuntien kokonaisluvuksi (jollei aine hajoa merkittävästi minuuteissa tai muutamassa tunnissa), mutta ei päivien kokonaisluvuksi. Testiaineen jäännösaktiivisuuden (^{14}C-leimattujen aineiden osalta) tai jäännöspitoisuuden (leimaamattomien aineiden osalta) estimaatit esitetään graafisesti ajan funktiona sekä lineaarisena että puolilogaritmisena käyränä (ks. kuvat 1a ja 1b). Jos hajoamista on tapahtunut, testipulloista F_T saatuja tuloksia verrataan testipulloista F_S saatuihin tuloksiin. Jos testiaineen sisältävistä testipulloista (F_T) ja steriileistä testipulloista (F_S) saatujen tulosten keskiarvot poikkeavat alle 10 %, voidaan olettaa, että todettu hajoaminen on pääasiassa abioottista. Jos hajoaminen testipulloissa F_S on vähäisempää, tuloksia voidaan käyttää testipulloilla F_T saatujen tulosten korjaamiseen (vähennys) biohajoamisen laajuuden estimoimiseksi. Jos merkittävistä muuntumistuotteista tehdään (vaihtoehtoisia) lisäanalyyseja, niiden muodostumista ja hajoamista koskevat käyrät tulisi esittää testiaineen hajoamiskäyrän lisäksi.

Lag-vaiheen kesto t_L estimoidaan hajoamiskäyrästä (puolilogaritmisesta käyrästä) ekstrapoloimalla sen lineaarinen osa tasolle, jolla hajoaminen on nolla, tai vaihtoehtoisesti määrittämällä aika noin 10 prosentin hajoamiselle (ks. kuvat 1a ja 1b). Puolilogaritmisesta käyrästä estimoidaan ensimmäisen kertaluvun nopeusvakio k ja sen keskivirhe lineaarisella regressiolla kuvaajasta ln (^{14}C-jäännösaktiivisuus tai testiaineen pitoisuus) vs. aika. Erityisesti ^{14}C-mittausten osalta käytetään ainoastaan käyrän ensimmäiseen lineaariseen osaan liittyviä tuloksia, ja tällöin mieluummin pientä määrää tarkkoja tuloksia kuin suurempaa määrää epätarkempia tuloksia. Epätarkkuudella tarkoitetaan tässä muun muassa suositeltuun ^{14}C-jäännösaktiivisuuden suoraan määritykseen liittyviä ominaisvirheitä (ks. jäljempänä). Joskus voi olla tarkoituksenmukaista laskea kaksi eri nopeusvakiota, jos hajoaminen tapahtuu kahdessa vaiheessa. Tätä varten määritellään kaksi eri vaihetta hajoamiskäyrässä. Nopeusvakio (k) ja puoliintumisaika ($t_{½}$ = ln2/k) tulisi laskea kullekin rinnakkaiselle näytteelle siinä tapauksessa, että niistä otetaan osanäytteitä; keskiarvoja voidaan käyttää siinä tapauksessa, että näytteeksi otetaan kokonaisia testipulloja kunakin näytteenottoajankohtana (ks. kohta 1.8.9.2, viimeinen kappale). Käytettäessä ensin mainittua menettelyä nopeusvakio ja puoliintumisaika olisi ilmoitettava kullekin yksittäiselle rinnakkaiselle näytteelle sekä lisäksi keskiarvona keskivirheineen. Jos testiainetta on käytetty suurina pitoisuuksina, hajoamiskäyrä voi poiketa merkittävästi suorasta viivasta (puolilogaritminen kuvio) ja reaktio ei ehkä edusta ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa. Puoliintumisajan määrittäminen ei tällöin ole mielekästä. Rajoitettuun tulosjoukkoon voidaan kuitenkin soveltaa pseudo-ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa ja estimoida hajoamisen puoliintumisaika DT_{50} (aika, jossa saavutetaan 50 % hajoamisesta). On kuitenkin muistettava, että valitun tulosjoukon ulkopuolella hajoamisaikaa ei voida ennustaa käyttäen DT_{50}:a, joka on vain tietyn tulosjoukon kuvaaja. Tilastolaskelmia ja käyrän sovitusta helpottavia analyysivälineitä on helposti saatavilla, ja tällaisten ohjelmistojen käyttö on suositeltavaa.

Jos käytetään erityistä kemiallista analyysia, primaarisen hajoamisen nopeusvakiot ja puoliintumisajat estimoidaan edellä kuvatulla tavalla kokonaismineralisaatiolle. Jos primaarinen hajoaminen rajoittaa reaktion nopeutta, voidaan käyttää datapisteitä koko hajoamisajalta. (^{14}C-aktiivisuuden mittauksista poiketen kyseiset mittaukset tehdään suorina määrityksinä.)

Jos käytetään ^{14}C-leimattuja aineita, massatase tulisi ilmaista prosenttiosuutena annostellusta alkuperäisestä pitoisuudesta ainakin testin lopussa.

2.1.2 **Jäännösaktiivisuus**

Kun orgaanisen aineen ^{14}C-leimattu osa biohajoaa, suurin osa ^{14}C:stä muuttuu $^{14}CO_2$:ksi ja osa käytetään biomassan kasvuun ja/tai solunulkoisten metaboliittien synteesiin. Aineen täydestä eli ”lopullisesta” biohajoamisesta ei sen vuoksi ole tuloksena, että sen sisältämä hiili muuttuu 100-prosenttisesti $^{14}CO_2$:ksi. Biosynteesin kautta muodostuneisissa tuotteissa oleva ^{14}C vapautuu myöhemmin hitaasti $^{14}CO_2$:na ”sekundaarisen mineralisaation” vuoksi. Näistä syistä orgaanisen ^{14}C-jäännösaktiivisuuden (joka on mitattu CO_2:n poiston jälkeen) tai muodostuneen $^{14}CO_2$:n käyrät ajan funktiona ulottuvat hajoamisen päättymisajankohdan yli (”*tailing*”). Tämä monimutkaistaa tulosten kineettistä tulkintaa, minkä vuoksi vain käyrän ensimmäistä osaa (joka alkaa lag-vaiheen päättymisestä ja päättyy ennen 50 prosentin hajoamisen saavuttamista) tulisi normaalisti käyttää hajoamisen nopeusvakion estimoinnissa. Jos testiainetta on hajonnut, orgaanisen ^{14}C:n jäännösaktiivisuus on aina suurempi kuin jäljellä olevan vielä hajoamattoman testiaineen ^{14}C-aktiivisuus. Jos testiaineen hajoamisreaktio on ensimmäistä kertalukua ja konstantti fraktio α mineralisoituu CO_2:ksi, ^{14}C:n häviämiskäyrän (orgaanisen ^{14}C:n kokonaismäärä vs. aika) alkukaltevuus on α kertaa testiaineen (tai tarkemmin sanoen testiaineen ^{14}C-leimalla merkityn osan) pitoisuutta kuvaavan vastaavan käyrän kaltevuus. Orgaanisen ^{14}C:n kokonaisaktiivisuuden korjaamattomien mittausten perusteella laskettuun hajoamisen nopeusvakioon liittyy virhemarginaali. Kirjallisuudessa kuvataan menetelmiä estimoida testiaineen pitoisuudet mitatuista radiokemiallisista aktiivisuuksista erilaisten yksinkertaistusoletusten perusteella (2)(9)(10)(11). Näitä menetelmiä voidaan parhaiten soveltaa nopeasti hajoaviin aineisiin.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Jos todetaan, että k ei riipu pitoisuuden lisäämisestä (toisin sanoen jos laskettu k:n arvo on suunnilleen sama testiaineen eri pitoisuuksilla), ensimmäisen kertaluvun nopeusvakion voidaan olettaa edustavan käytettyjä testiolosuhteita (testiaine, vesinäyte ja testilämpötila). Se, missä määrin tulokset voidaan yleistää tai ekstrapoloida muita järjestelmiä koskeviksi, on määritettävä asiantuntija-arviona. Jos testiainetta käytetään suurena pitoisuutena ja hajoaminen ei siksi noudata ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa, tuloksia ei voida käyttää ensimmäisen kertaluvun nopeusvakion tai vastaavan puoliintumisajan suoraan estimointiin. Tällaisesta testistä, jossa testiainetta käytetään suurena pitoisuutena, saatuja tuloksia voidaan ehkä silti kuitenkin käyttää mineralisaation kokonaisasteen estimointiin ja/tai muuntumistuotteiden havaitsemiseen ja kvantifiointiin.

Jos muiden häviämisprosessien kuin biohajoamisen (esim. hydrolyysin tai haihtumisen) nopeudet tunnetaan, ne voidaan vähentää testin aikana todetusta nettohäviämisnopeudesta, jolloin saadaan summittainen estimaatti biohajoamisnopeudelle. Hydrolyysiä koskeva data voidaan saada esimerkiksi steriilistä kontrollista tai rinnakkaisesta testistä, jossa käytetään suurempaa testiaineen pitoisuutta.

$^{14}CO_2$:n epäsuoraa ja suoraa määritystä (ks. kohta 1.8.9.4 ja liite 3) voidaan käyttää vain mitattaessa sitä, missä määrin testiaine mineralisoituu CO_2:ksi. Radiokromatografiaa (RAD-TLC) tai HPLC:tä voidaan käyttää analysoitaessa ^{14}C-leimatun testiaineen pitoisuuksia ja merkittävien muuntumistuotteiden muodostumista (ks. kohta 1.8.9.4, kolmas kappale). Puoliintumisajan suoran estimoinnin ehtona on, ettei merkittäviä muuntumistuotteita ole (muuntumistuote on merkittävä, jos se on ≥ 10 % testiaineen annostellusta määrästä). Jos merkittäviä muuntumistuotteita on, on tehtävä yksityiskohtainen arviointi tuloksista. Tähän voi sisältyä muuntumistuotteiden uusi testaaminen ja/tai yksilöinti (ks. kohta 1.8.9.5, ensimmäinen kappale), jollei muuntumistuotteiden muodostumista voida kohtuudella arvioida kokemuksen perusteella (esim. tiedot hajoamisreitistä). Koska se, missä määrin testiaineessa oleva hiili muuttuu CO_2:ksi, vaihtelee (riippuen paljolti testiaineen ja mahdollisten muiden substraattien pitoisuudesta, testiolosuhteista ja mikrobiyhteisöstä), tämän testin perusteella ei voida tehdä suoraa estimointia lopullisesta biohajoamisesta kuten DOC Die-Away -testissä, vaan testissä saatava tulos vastaa respirometrisessä testissä saatavaa tulosta. Mineralisaatioaste on näin ollen pienempi tai yhtä suuri kuin lopullisen biohajoamisen vähimmäistaso. Jotta lopullisesta biohajoamisesta saataisiin täydellisempi käsitys (mineralisaatio ja sitoutuminen biomassaan), ^{14}C:n faasijakauman analyysi tulisi tehdä testin lopussa (ks. liite 1). Hiukkasissa oleva ^{14}C koostuu bakteeribiomassaan sitoutuneesta ^{14}C:sta ja orgaanisiin partikkeleihin kiinnittyneestä ^{14}C:sta.

2.3 TESTIN VALIDITEETTI

Jos vertailuaine ei hajoa ennakoidussa ajassa (aniliinin ja natriumbentsoaatin odotettu hajoamisaika on yleensä alle 2 viikkoa), testin validiteettia on epäiltävä ja se on tarkistettava. Vaihtoehtoisesti testi toistetaan uudella vesinäytteellä. Menetelmän ISO-yhteistutkimuksessa (*ring test*), johon osallistui seitsemän laboratoriota eri puolilla Eurooppaa, "adaptoituneet" hajoamisen nopeusvakiot aniliinille vaihtelivat välillä 0,3–1,7 päivä$^{-1}$. Keskiarvo oli 0,8 päivä$^{-1}$ 20 °C:ssa keskivirheellä ± 0,4 päivä$^{-1}$ ($t_{½}$ = 0,9 päivää). Lag-vaiheet keskivät tyypillisesti 1–7 päivää. Tutkituissa testivesissä kirjattiin olevan bakteeribiomassa, joka vastaa 10^3–10^4 pesäkkeitä muodostavaa yksikköä (CFU) ml:ssa. Hajoamisnopeudet runsasravinteisissa keskieurooppalaisissa vesissä olivat suurempia kuin pohjoisissa oligotrofisissa vesissä, mikä voi johtua eroista ravinteisuudessa tai aiemmasta altistuksessa kemiallisille aineille.

Kokonaissaannon (massataseen) tulisi testin lopussa olla 90–110 % radioaktiivisella leimalla merkittyjen aineiden osalta, ja alkuperäisen saannon testin alussa tulisi olla 70–110 % leimaamattomien aineiden osalta. Näitä vaihteluvälejä tulisi kuitenkin pitää pelkästään tavoitteina eikä perusteina testin hyväksymiselle.

3. **TESTISELOSTE**

Testin tyyppi (onko kyseessä pelaginen vai suspendoituneen sedimentin testi) on ilmoitettava selvästi testiselosteessa, jossa on lisäksi oltava ainakin seuraavat tiedot:

Testiaine ja vertailuaine(et):

— testi- ja vertailuaineen yleisnimet, kemialliset nimet (mieluiten IUPAC ja/tai CAS-nimet), CAS-numerot, rakennekaavat (radioaktiivista merkkiainetta käytettäessä maininta siitä, missä molekyylin osassa ^{14}C on) ja relevantit fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. kohdat 1.5 ja 1.6),

— muuntumistuotteiden yksilöinnissä ja niiden pitoisuuksien määrittämisessä standardeina käytettävien aineiden kemialliset nimet, CAS-numerot, rakennekaavat (radioaktiivista merkkiainetta käytettäessä maininta siitä, missä molekyylin osassa ^{14}C on) ja relevantit fysikaalis-kemialliset ominaisuudet,

— testi-vertailuaineen puhtaus (epäpuhtaudet),

— merkkiaineella leimatun kemikaalin radiokemiallinen puhtaus ja spesifinen aktiivisuus (tapauksen mukaan).

Pintavesi:

Vesinäytteestä on ilmoitettava seuraavat vähimmäistiedot:

— näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus, mukaan luettuina taustatiedot saastumisesta, jos ne ovat saatavissa,

— näytteenottopäivä ja -ajankohta,

— ravinteet (kokonais-N, ammonium, nitriitti, nitraatti, kokonais-P, liuennut ortofosfaatti),

— näytteenottosyvyys,

— näytteen ulkonäkö (esim. väri ja sameus),

— DOC ja TOC,

— biokemiallinen hapentarve (BOD),

— lämpötila ja pH näytteenottopaikassa näytteenottoajankohtana,

— happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali (redoxpotentiaali) (vain siinä tapauksessa, että aerobiset olosuhteet eivät ole ilmeiset),

— suolapitoisuus tai johtavuus (meri- ja murtoveden tapauksessa),

— suspendoitunut kiintoaines (jos näyte on samea),

— mahdolliset muut relevantit tiedot näytteenottopaikasta näytteenottoajankohtana (esim. tiedot jokien tai merivirtojen nykyisistä tai aiemmista virtausnopeuksista, merkittävistä päästöistä paikan läheisyydessä ja päästöjen tyypistä, näytteenottoajankohtaa edeltäneet sääolot),

ja vaihtoehtoisesti:

— mikrobibiomassa (esim. AODC (suoralaskenta akridiinioranssivärjäyksen jälkeen) tai pesäkkeitä muodostavat yksiköt),

— epäorgaaninen hiili,

— klorofylli a:n pitoisuus spesifisenä leväbiomassan arviona.

Jos tehdään suspendoituneen sedimentin testi, tulisi lisäksi antaa seuraavat tiedot sedimentistä:

— sedimentin keräyssyvyys,

— sedimentin ulkonäkö (värillinen, sakkainen, lietteinen tai hiekkainen),

— koostumus (esim. prosentteina karkeaa hiekkaa, hienoa hiekkaa, lietettä ja savea),

— suspendoituneen kiintoaineksen kuivapaino g/l, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus tai WLOI (painonmenetys kuumennuksen jälkeen) orgaanisen ainesisällön mittana,

— pH,

— happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali (redoxpotentiaali) (vain siinä tapauksessa, että aerobiset olosuhteet eivät ole ilmeiset).

Testiolosuhteet:

— keräyksen ja laboratoriotestissä käytön välinen aika, näytteen varastointi ja esikäsittely, kokeiden tekopäivät,

— annosteltu testiaineen määrä, testipitoisuus ja vertailuaine,

— testiaineen annostelumenetelmä, mukaan luettuna mahdollinen liuottimien käyttö,

— käytetty pintaveden ja sedimentin (jos sitä käytetään) volyymi ja kullakin aikavälillä näytteeksi otettu volyymi,

— kuvaus käytetystä testijärjestelmästä.

Jos testiä ei ole tarkoitus tehdä pimeässä, tiedot ”heikon valon” olosuhteista;

— tiedot steriilien kontrollien valmistukseen käytettävästä menetelmästä tai menetelmistä (esim. lämpötila, autoklaavikäsittelyjen ajankohta ja lukumäärä),

— inkubointilämpötila,

— tiedot analyysitekniikoista ja menetelmästä tai menetelmistä, joita käytetään radiokemiallisiin mittauksiin sekä massataseen tarkistamiseen ja faasijakauman mittauksiin (jos ne tehdään),

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— saantoprosentit (ks. kohta 1.7.1),

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys, mukaan luettuina havaitsemisraja (LOD) ja määritysraja (LOQ) (ks. kohta 1.7.2),

— kaikki mitatut tiedot (mukaan luettuina näytteenottoajankohdat) ja lasketut arvot taulukkomuodossa sekä hajoamiskäyrät; kunkin testipitoisuuden ja kunkin rinnakkaisen testipullon osalta ilmoitetaan lineaarinen korrelaatiokerroin logaritmisen käyrän kaltevuudelle, arvioitu lag-vaihe ja ensimmäisen kertaluvun tai pseudo-ensimmäisen kertaluvun nopeuskerroin (jos mahdollista) sekä vastaava hajoamisen puoliintumisaika (t_{50}),

— relevantit arvot ilmoitetaan yksittäisissä rinnakkaisnäytteissä saatujen tulosten keskiarvoina (esim. lag-vaiheen pituus, hajoamisen nopeusvakio ja hajoamisen puoliintumisaika (t_{50})),

— järjestelmä luokitellaan joko ei-adaptoituneeksi tai adaptoituneeksi päätellen hajoamiskäyrän ulkonäöstä ja mahdollisesta testipitoisuuden vaikutuksesta,

— lopullisen massatasetarkistuksen tulokset ja faasijakaumamittausten tulokset (jos ne on tehty),

— mineralisoitunut ^{14}C-fraktio ja (käytettäessä erityisiä analyyseja) primaarisen hajoamisen lopullinen taso,

— merkittävien muuntumistuotteiden yksilöinti, molaarinen pitoisuus ja prosenttiosuus (ks. kohta 1.8.9.5, ensimmäinen kappale) (tapauksen mukaan),

— oletettu muuntumisreitti (tapauksen mukaan),

— tulosten pohdinta.

4. KIRJALLISUUS

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

4. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394–401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274–283.

11. ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

Liite 1

^{14}C:n faasijakauma

Testimenettelyn tarkistamiseksi orgaanisen ^{14}C:n kokonaisaktiivisuuden (TOA) normaalimittausten lisäksi tulisi tehdä massataseen mittauksia tekemällä muodostuneen $^{14}CO_2$:n suora määritys sen jälkeen, kun se on erotettu imeyttimeen (ks. liite 3). Positiivinen $^{14}CO_2$:n muodostuminen on itsessään suora osoitus siitä, että kyseessä on biohajoaminen eikä abioottinen hajoaminen tai muu häviämisprosessi, kuten haihtuminen tai sorptio. Hyödyllisiä lisätietoja, jotka tarkentavat biohajoamisen luonnetta, voidaan saada mittauksista, jotka koskevat TOA:n jakautumista liukoiseen hiileen (liukoisen orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus, DOA) ja partikkelimuodossa olevaan hiileen (partikkelimuodossa olevan orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus, POA) sen jälkeen, kun partikkelimuodossa oleva hiili on erotettu kalvosuodatuksella tai sentrifugoimalla. POA muodostuu mikrobibiomassaan ja muihin partikkeleihin kiinnittyneestä testiaineesta sekä siitä testiaineessa olevasta hiilestä, joka on käytetty uuden solumateriaalin synteesiin ja joka näin ollen sisältyy biomassan hiukkasfraktioon. Liukoisen orgaanisen ^{14}C:n muodostuminen voidaan arvioida määrittämällä DOA biohajoamisen lopussa (biohajoamista ajan funktiona kuvaavan käyrän tasanne).

Jäännös-^{14}C:n faasijakauma estimoidaan valituissa näytteissä suodattamalla näytteitä kalvosuodattimella, jonka huokoskoko on 0,22–0,45 μm ja jonka materiaali ei adsorboi merkittäviä määriä testiainetta (polykarbonaattisuodattimet voivat olla sopivia). Jos testiaineen sorptio suodattimeen on liian suurta, jotta sen voisi jättää huomiotta (tarkistettava ennen koetta), nopeaa sentrifugointia (2 000 g; 10 min) voidaan käyttää suodatuksen sijaan.

Suodosta tai sentrifugaattia käsitellään siten, kuin kuvataan liitteessä 3 suodattamattomien näytteiden osalta. Kalvosuodattimet liuotetaan sopivaan tuikenesteeseen, minkä jälkeen laskenta tapahtuu tavalliseen tapaan, yleensä käyttäen pelkästään ulkoisen standardin menetelmää vaimennuksen korjaamiseen tai käyttämällä hapetinta. Jos on käytetty sentrifugointia, hiukkasfraktiosta muodostettu pelletti suspendoidaan uudelleen 1–2 ml:aan tislattua vettä ja pannaan tuikelaskentapulloon. Tämän jälkeen tehdään kaksi huuhtelua käyttäen 1 ml tislattua vettä, ja huuhteluvesi lisätään pulloon. Tarvittaessa suspensio voidaan yhdistää geeliin nestetuikelaskennan suorittamiseksi.

Liite 2

Puolijatkuva prosessi

Inkubointia voidaan joutua jatkamaan pitkään, jopa useita kuukausia, jotta heikosti hajoavat aineet hajoaisivat riittävästi. Testin kesto ei tavallisesti saisi ylittää 60:tä päivää, jollei alkuperäisen vesinäytteen ominaisuuksia pidetä yllä uudistamalla testisuspensiota. Testin kesto voidaan kuitenkin pidentään enimmillään 90 päivään ilman, että testisuspensiota tarvitsee uudistaa, jos testiaineen hajoaminen on alkanut ensimmäisten 60 päivän aikana.

Inkuboinnin kestäessä pitkään mikrobiyhteisön diversiteetti voi vähentyä eri häviämisprosessien vuoksi ja siksi, että olennaisia ravinteita ja primaarisia hiilisubstraatteja saattaa hävitä vesinäytteestä. Siksi suositellaan käytettäväksi puolijatkuvaa testiä, jolla hitaasti hajoavien aineiden hajoamisnopeus voidaan määrittää riittävästi. Puolijatkuvaa prosessia tulisi käyttää testin alusta alkaen, jos aiemman kokemuksen perusteella odotetaan tarvittavan kolmen kuukauden inkubointiaika, jotta testiaine hajoaisi 20 prosenttia. Vaihtoehtoisesti normaali panostesti (*batch*) voidaan muuttaa testin aikana puolijatkuvaksi testiksi, jos testiaineen hajoamista ei ole tapahtunut noin 60 päivän kuluessa panostestimenettelyä käyttäen. Puolijatkuva menettely voidaan lopettaa ja testiä jatkaa panostestinä, kun hajoamista on tapahtunut merkittävästi (esim. > 20 %).

Puolijatkuvassa testissä noin kolmasosa testisuspension määrästä korvataan kahden viikon välein vasta otetulla uudella vedellä, johon on lisätty testiaine alkuperäisessä pitoisuudessa. Samoin sedimentti lisätään uuteen veteen alkuperäisessä pitoisuudessa (0,01–1 g/l), jos tehdään (vaihtoehtoinen) suspendoituneen sedimentin testi. Tehtäessä testiä suspendoituneella kiinteällä sedimentillä on tärkeää, että järjestelmä pidetään täysin suspendoituneena myös korvattaessa vettä uudella ja että kiintoaineksen ja veden oloaika järjestelmässä on sama, koska muuten järjestelmä ei ehkä halutulla tavalla vastaa homogeenista vesijärjestelmää, jossa ei ole faaseja. Näistä syistä suspendoituneen sedimentin alkuperäisen pitoisuuden tulisi puolijatkuvaa menettelyä käytettäessä mieluiten olla annetun vaihteluvälin alapäässä.

Testiohjeen mukainen testiaineen lisääminen edellyttää, että testiaineen alkuperäistä pitoisuutta ei ylitetä testisuspension osittaisen uudistamisen yhteydessä ja että näin vältetään adaptaatio, joka usein tapahtuu, kun testiaine on suurina pitoisuuksina. Koska prosessiin kuuluu sekä uudelleensiirrostus että poistuneiden ravinteiden ja primaaristen substraattien korvaaminen, alkuperäinen mikrobidiversiteetti palautuu ennalleen ja testin kestoa voidaan jatkaa periaatteessa loputtomiin. Puolijatkuvaa menettelyä käytettäessä on tärkeää huomata, että testiaineen jäännöspitoisuus on korjattava kunkin uudistamisen yhteydessä lisättyihin ja poistettuihin testiainemääriin nähden. Testiaineen kokonaispitoisuuden ja liukoisen pitoisuuden voidaan katsoa olevan samoja sellaisten yhdisteiden tapauksessa, joiden osalta sorptio on vähäinen. Sorptio on testiohjeen mukaisissa olosuhteissa (0,1–1 g kiintoainesta/l) merkityksetön (< 5 %) aineille, joiden log K_{ow} < 3 (koskee neutraaleja, lipofiilisiä yhdisteitä). Tämä käy ilmi seuraavasta esimerkistä: 0,1 g/l kiintoainesta vastaa karkeasti 10 mg:aa hiiltä litraa kohti (hiilifraktio f_C = 0,01). Olkoon

(testiaineen) log K_{ow} = 3

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

ja jakaantumiskerroin, $K_d = f_C \times K_{oc}$

Tällöin liuennut fraktio kokonaispitoisuudesta (C-vesi (C_w)/C-kokonais (C_t) on:

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

Liite 3

$^{14}CO_2$:n määritys

Epäsuora $^{14}CO_2$:n määritys

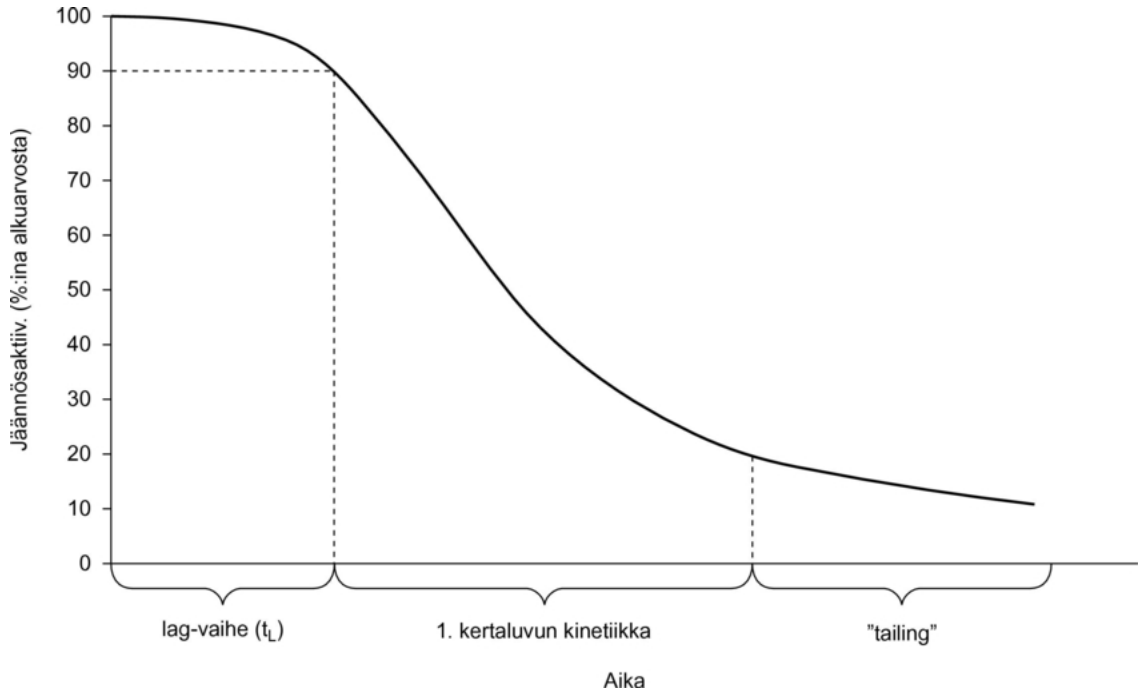
Normaalimittauksissa epäsuora menetelmä on tavallisesti vähiten aikaa vievä ja tarkin menetelmä, jos testiaine ei ole haihtuva eikä muodosta haihtuvia muuntumistuotteita. Suodattamattomia näytteitä (esim. 5 ml kukin) lisätään tuikelaskentapulloihin. Sopiva alkuperäinen aktiivisuus näytteissä on 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq), ja sen on oltava vähintään noin 1 000 dpm. CO_2 poistetaan sen jälkeen, kun näyte on happamoitettu pH-arvoon 2–3 yhdellä tai kahdella tipalla väkevää H_3PO_4:a tai HCl:a. CO_2 voidaan poistaa poreiluttamalla ilmalla noin 1/2–1 tunnin ajan. Vaihtoehtoisesti pulloja voidaan ravistaa voimakkaasti 1–2 tunnin ajan (esim. mikrotiitterilevyjen ravistimessa) tai jättää kevyempään ravistukseen yön yli. CO_2:n poiston tehokkuus on tarkistettava (ja tarvittaessa jatkettava ilmastus- tai ravistusaikaa). Vesinäytteiden laskentaan sopiva tuikeneste lisätään, näyte homogenisoidaan sekoittimessa ja radioaktiivisuus määritetään nestetuikelaskennalla vähentäen nollanäytteissä havaittu tausta-aktiivisuus (F_B). Jollei testivesi ole selvästi värjääntynyt tai sisällä suurta hiukkaspitoisuutta, näytteissä havaittava vaimennus on tavallisesti yhtä suurta kaikissa ja sen korjaamiseksi riittää ulkoisen standardin käyttö. Jos testivesi on selvästi värjääntynyttä, vaimennus voidaan joutua korjaamaan sisäisen standardin lisäyksellä. Jos hiukkaspitoisuus on suuri, homogeenistä liuosta tai geeliä ei ehkä saada aikaan tai vaimennus saattaa vaihdella merkittävästi näytteiden välillä. Tällöin voidaan käyttää jäljempänä testilietteille kuvattua menetelmää. Jos testi suoritetaan suspendoituneen sedimentin testinä, $^{14}CO_2$:n epäsuora mittaus voidaan tehdä ottamalla homogeeninen 10 ml:n näyte testivettä/suspensiota ja erottamalla faasit sentrifugoimalla sopivalla nopeudella (esim. 40 000 m/s^2 15 min). Vesifaasia käsitellään sitten edellä kuvatulla tavalla. Partikkelimuodossa olevan ^{14}C:n aktiivisuus (POA) määritetään suspendoimalla sedimentti uudelleen pieneen määrään tislattua vettä, panemalla se tuikelaskentapulloihin ja lisäämällä tuikeneste geelin muodostamiseksi (tätä varten on olemassa erityisiä tuikenesteitä). Hiukkasten luonteesta (esim. niiden orgaanisen aineen sisällöstä) riippuen näytettä voidaan käsitellä yön yli kudoksen liukenemista edistävällä aineella ja sen jälkeen homogenisoida sekoittimessa ennen tuikenesteen lisäämistä. Vaihtoehtoisesti POA voidaan määrittää hapen määrän ylittävällä poltolla käyttäen hapetinta. Sisäiset standardit tulisi aina ottaa lukuun laskennassa, ja vaimennus voi olla tarpeen korjata sisäisen standardin lisäyksellä kunkin yksittäisen näytteen osalta.

Suora $^{14}CO_2$:n määritys

Jos muodostuneesta $^{14}CO_2$:sta tehdään suora määritys, testiin tulisi ottaa useampia testipulloja testin alussa. Kussakin mittauskohdassa otetaan näytteeksi kokonaisia testipulloja, niiden sisältö happamoitetaan pH-arvoon 2–3 ja kerätään $^{14}CO_2$ sisäiseen (testin alussa kunkin testipullon sisään asetettuun) tai ulkoiseen absorbointijärjestelmään. Absorboivana aineena voidaan käyttää emästä (esim. 1 N NaOH -liuos tai NaOH-pelletti), etanoliamiinia tai etanoliamiinipohjaista absorbenttia tai kaupallisesti saatavilla olevia absorbentteja. $^{14}CO_2$:n suoraa määritystä varten testipullot tulisi sulkea esimerkiksi butyylikumikalvolla.

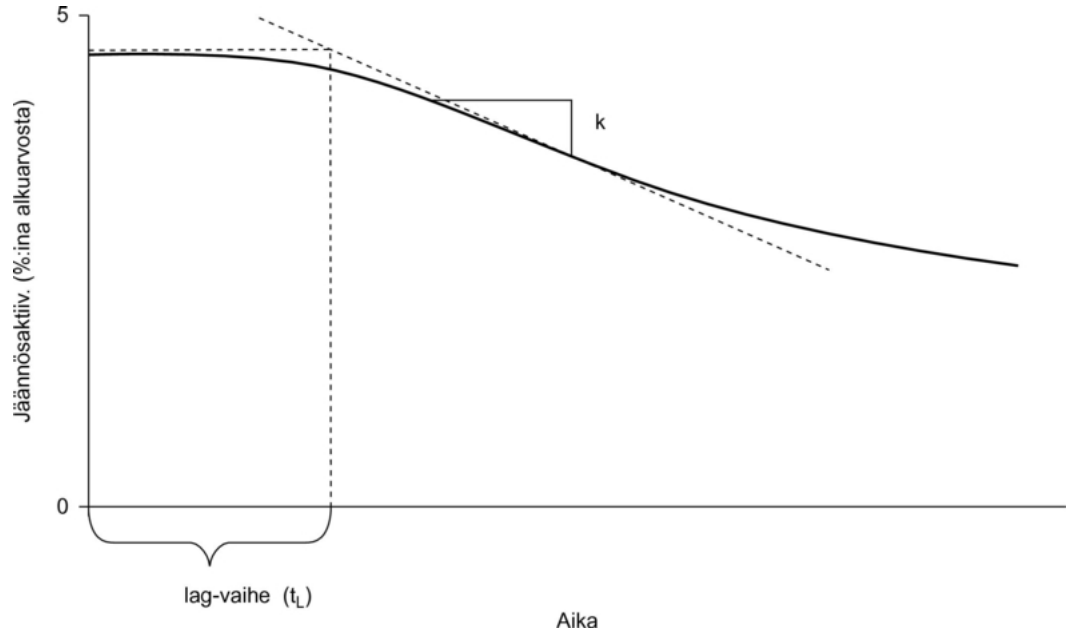
Kuva 1a

Esimerkki aritmeettisesta käyrästä (jäännösaktiivisuus vs. aika)



Kuva 1b

Esimerkki puolilogaritmisesta käyrästä (ln jäännösaktiivisuus vs. aika)



LIITE VI

C.26. **LIMASKOJEN (*LEMNA SP.*) KASVUNESTYMISTESTI**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 221, 2006 (1). EU:n viranomaiset ovat olleet laajalti sitä mieltä, että *Lemna*-testi on sopiva vaihtoehto levätestille silloin, kun aineet ovat voimakkaan värisiä (2)(3).

1.1 JOHDANTO

Tällä testimenetelmällä arvioidaan aineiden myrkyllisyyttä *Lemna*-sukua (limaskat) oleville makean veden kasveille. Menetelmä perustuu olemassa oleviin testiohjeisiin (4)(5)(6)(7)(8)(9), mutta niitä on muutettu viimeaikaisten tutkimustulosten ja keskeisiä kysymyksiä koskevien konsultointien pohjalta. Ehdotettu menetelmä on validoitu kansainvälisellä yhteistutkimuksella (ring test) (10).

Testimenetelmässä kuvataan myrkyllisyyden testausta, jossa käytetään *Lemna gibba*- ja *Lemna minor* -lajeja. Kumpaakin lajia on tutkittu laajalti ja käytetty edellä mainituissa standardeissa. *Lemna*-suvun lajien taksonomia on hankala, koska fenotyyppejä on monta. Vaikka *Lemna*-suvussa voi esiintyä geneettistä vaihtelevuutta vasteessa myrkyllisiin aineisiin, vaihtelevuuden syistä ei toistaiseksi ole saatavilla riittävästi tietoja, joiden pohjalta voitaisiin suositella tietyn kloonin käyttöä tässä testimenetelmässä. On syytä huomata, että testiä ei suoriteta aksenikaalisesti, vaan testin eri vaiheissa toteutetaan toimia, joilla muista eliöistä johtuva kontaminaatio pyritään pitämään mahdollisimman pienenä.

Testimenetelmässä kuvataan yksityiskohtaisesti testausta, jossa testiliuos vaihtuu (semistaattinen ja läpivirtausmenetelmä) tai ei vaihdu (staattinen menetelmä). Testin tavoitteista ja sääntelyvaatimuksista riippuen on suositeltavaa harkita semistaattisten tai läpivirtausmenetelmien käyttöä muun muassa sellaisten aineiden testauksessa, jotka häviävät nopeasti liuoksesta haihtumisen, valohajoamisen, saostumisen tai biohajoavuuden vuoksi. Tästä annetaan tarkempia ohjeita kirjallisuusviitteessä (11).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä ja lyhenteitä:

Biomassa: Populaatiossa olevan elävän materiaalin kuivapaino. Tässä testissä biomassaa mitataan usein epäsuorasti esimerkiksi versojen lukumäärän tai pinta-alan avulla, minkä vuoksi ”biomassa”-termi viittaa myös näihin korvaaviin menetelmiin.

Kloroosi: Versosolukon kellastuminen.

Klooni: Eliö tai solu, joka on saanut alkunsa yhdestä yksilöstä suvuttoman lisääntymisen tuloksena. Samaan klooniin kuuluvat yksilöt ovat siis geneettisesti identtisiä.

Kolonia: Versojen muodostama yhdyskunta, jossa emo- ja tytäryksilöt (yleensä 2–4 yksilöä) ovat kiinnittyneet toisiinsa. Kutsutaan joskus kasviksi.

EC_x: Testiviljelyaineeseen liuenneen testiaineen pitoisuus, jossa *Lemna*n kasvu vähenee x prosenttia (esimerkiksi 50 prosenttia) määrätyn altistusajan kuluessa (altistusaika on mainittava erikseen, jos se poikkeaa testin kokonaiskestosta tai normaalista kestosta). Jotta kasvunopeudesta ja tuotoksesta johdetut EC-arvot erottuisivat selvästi toisistaan, edellisestä käytetään symbolia ”E_rC” ja jälkimmäisestä symbolia ”E_yC”, joiden jälkeen mainitaan mittausmuuttuja, esimerkiksi E_rC (versojen lukumäärä).

Läpivirtaustesti: Testi, jossa testiliuokset vaihtuvat jatkuvasti.

Verso: Limaskakasvin yksittäinen lehden kaltainen rakenne. Se on pienin lisääntymiskykyinen yksikkö eli yksilö.

Kupruisuus: Kupuroiden tai turpoamien esiintyminen versoissa.

Kasvu: Mittausmuuttujan, kuten versojen lukumäärän, kuivapainon, märkäpainon tai versojen pinta-alan, kasvaminen testijakson aikana.

Kasvunopeus (**keskimääräinen spesifinen kasvunopeus**): Biomassan logaritminen kasvu altistuksen aikana.

Pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC): Pienin testattu pitoisuus, jossa aineella havaitaan olevan tietyn altistusajan kuluessa tilastollisesti merkittävä kasvua vähentävä vaikutus verrattuna kontrolliin (kun $p < 0,05$). Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Mittausmuuttujat: Kaikentyyppiset muuttujat, jotka mitataan testin päätepisteen ilmaisemiseksi yhden tai useamman erilaisen vastemuuttujan avulla. Tässä menetelmässä mittausmuuttujia ovat versojen lukumäärä, versojen pinta-ala sekä tuorepaino ja kuivapaino.

Monokulttuuri: Yhtä kasvilajia sisältävä viljelmä.

Nekroosi: Kuollut (valkoinen tai veden turvottama) versosolukko.

Pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC): Lähin LOEC-pitoisuutta pienempi testipitoisuus.

Fenotyyppi: Eliön havaittavissa olevat ominaisuudet, jotka määräytyvät eliön geenien ja ympäristön välisestä vuorovaikutuksesta.

Vastemuuttujat: Muuttujat, joiden avulla arvioidaan myrkyllisyyttä. Vastemuuttujat johdetaan erilaisia laskentamenetelmiä käyttämällä mistä tahansa mitatusta muuttujasta, joka kuvaa biomassaa. Tässä menetelmässä kasvunopeudet ja tuotos ovat vastemuuttujia, jotka on johdettu mittausmuuttujista, kuten versojen lukumäärästä, versojen pinta-alasta, tuorepainosta tai kuivapainosta.

Semistaattinen (ajoittaisvaihtoinen) testi: Testi, jossa testiliuos vaihdetaan tietyin väliajoin testin aikana.

Staattinen testi: Testi, jossa testiliuosta ei vaihdeta testin aikana.

Testin päätepiste: Kuvaa yleistä tekijää, joka testin tavoitteen mukaisesti muuttuu testikemikaalin vaikutuksesta verrattuna kontrolliin. Tässä menetelmässä testin päätepisteenä on kasvun estyminen, joka voidaan ilmaista erilaisilla vastemuuttujilla, jotka perustuvat yhteen tai useampaan mittausmuuttujaan.

Testiviljelyaine: Täydellinen synteettinen ravinneliuos, jossa testikasvit kasvavat, kun ne altistetaan testiaineelle. Yleensä testiaine liuotetaan testiviljelyaineeseen.

Tuotos: Altistusajan lopussa mitattu biomassaa ilmaisevan mittausmuuttujan arvo, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu saman mittausmuuttujan arvo.

1.3 TESTIN PERIAATE

Lemna-sukuun kuuluvien eksponentiaalisesti kasvavien kasviviljelmien annetaan kasvaa seitsemän päivän ajan monokulttuureina testiaineen eri pitoisuuksissa. Testin tavoitteena on kvantifioida testiaineeseen liittyvät vaikutukset kasvien kasvuun tämän ajan kuluessa tiettyjen mittausmuuttujien arvioinnin perusteella. Ensisijaisena mittausmuuttujana on versojen lukumäärä. Lisäksi mitataan ainakin yhtä muuta mittausmuuttujaa (versojen kokonaispinta-alaa, kuivapainoa tai tuorepainoa), koska eräät aineet voivat vaikuttaa huomattavasti enemmän muihin mittausmuuttujiin kuin versojen lukumäärään. Testiaineeseen liittyvien vaikutusten kvantifioimiseksi testiliuoksissa tapahtunutta kasvua verrataan kontrolliryhmässä tapahtuneeseen kasvuun, minkä jälkeen määritetään pitoisuus, jossa kasvu estyy ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan EC_x-arvona (esimerkiksi EC_{50}).

Testin loppupisteenä on kasvun estyminen, joka ilmenee mittausmuuttujan logaritmisesta kasvusta (keskimääräisestä spesifisestä kasvunopeudesta) altistusaikana. Testiliuossarjassa mitattujen keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien avulla määritetään pitoisuus, jossa kasvunopeus vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_rC_x-arvona (esimerkiksi E_rC_{50}).

Toinen testimenetelmässä käytetty vastemuuttuja on tuotos, jota voidaan tarvita joissakin maissa erityisten sääntelyvaatimusten täyttämiseksi. Sillä tarkoitetaan altistusajan lopussa mitattua mittausmuuttujien arvoa, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu mittausmuuttujien arvo. Testiliuossarjassa mitatun tuotoksen avulla määritetään pitoisuus, jossa tuotos vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_yC_x-arvona (esimerkiksi E_yC_{50}).

Tilastollisesti voidaan määrittää myös pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) sekä pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC).

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Käytettävissä on oltava analyysimenetelmä, jolla testiviljelyaineessa oleva testiaine voidaan kvantifioida riittävän herkästi.

Testiainetta koskevia tietoja, joista voi olla hyötyä päätettäessä testiolosuhteista, ovat rakennekaava, puhtaus, vesiliukoisuus, stabiilius vedessä ja valossa, pK_a, K_{ow}, höyrynpaine ja biohajoavuus. Vesiliukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testiainetta häviää merkittävästi testin aikana. Tämän perusteella voidaan päättää, vaativatko tällaiset häviöt erityistoimia. Jos testiaineen liukoisuutta ja stabiiliutta koskevat tiedot ovat epäluotettavia, nämä ominaisuudet olisi arvioitava testiolosuhteissa, toisin sanoen siinä viljelyaineessa, lämpötilassa ja valaistuksessa, joita testissä käytetään.

Jos on erityisen tärkeää säädellä testiviljelyaineen pH:ta, esimerkiksi testattaessa metalleja tai hydrolyyttisesti epästabiileja aineita, on suositeltavaa lisätä testiviljelyaineeseen puskuria (ks. 1.7.4 kohdan ensimmäinen kappale). Kirjallisuusviitteessä (11) annetaan lisäohjeita sellaisten aineiden testauksesta, joiden fysikaaliskemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

1.5 VERTAILUAINE

Testimenetelmä voidaan tarkistaa testaamalla vertailuaine (-aineet), kuten 3,5-dikloorifenoli, jota on käytetty kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (10). Vertailuaine on suotavaa testata vähintään kahdesti vuodessa tai, jos testausta tehdään harvemmin, rinnakkain määritettäessä testiaineen myrkyllisyyttä.

1.6 TESTIN VALIDITEETTI

Jotta testi olisi validi, versojen lukumäärän on kaksinkertaistuttava kontrolliviljelmässä alle 2,5 päivässä (60 tunnissa), mikä vastaa noin seitsenkertaista kasvua seitsemän päivän kuluessa, kun keskimääräinen spesifinen kasvunopeus on 0,275 päivää kohden. Käytettäessä tässä testimenetelmässä kuvattuja testiliuoksia ja -olosuhteita tämä vaatimus voidaan täyttää käyttämällä staattista testausta (8). Vaatimus voidaan oletettavasti täyttää myös sellaisissa testiolosuhteissa, joissa käytetään semistaattista tai läpivirtausmenetelmää. Kaksinkertaistumisajan laskemista käsitellään tarkemmin kohdassa 2.1.

1.7 MENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 **Välineet**

Kaikkien välineiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Viljelyyn ja testaukseen käytettävien lasiastioiden on oltava steriilejä, ja ne on puhdistettava kemiallisista epäpuhtauksista, jotka voivat päästä testiviljelyaineeseen. Koeastioiden on oltava niin tilavia, että eri kolonioiden versot voivat kasvaa kontrolliastioissa peittämättä toisiaan testin lopussa. Ei ole haitaksi, vaikka juuret ulottuvat testiastioiden pohjaan, mutta on suositeltavaa, että kaikki koeastiat ovat syvyydeltään vähintään 20 mm ja tilavuudeltaan vähintään 100 ml. Koeastioiden valinnalla ei ole muuten ratkaisevaa merkitystä, jos nämä vaatimukset täyttyvät. Sopivan kokoiset dekantterilasit, kiteytysmaljat ja lasiset petrimaljat ovat kaikki osoittautuneet käyttökelpoisiksi. Haihtumisen ja tahattoman kontaminaation minimoimiseksi koeastiat on peitettävä, mutta samalla on huolehdittava riittävästä ilmanvaihdosta. Koeastiat ja varsinkaan niiden sulkimet eivät saa varjostaa tai muuttaa valon spektriominaisuuksia.

Viljelmiä ja koeastioita ei saa säilyttää toistensa kanssa. Sen vuoksi on paras käyttää erillisiä ilmastoituja kasvatuskaappeja, inkubaattoreita tai huoneita. Valaistuksen ja lämpötilan on oltava säädettävissä, ja ne on pidettävä tasaisina (ks. kohta 1.7.8).

1.7.2 **Koe-eliö**

Testissä käytetään *Lemna gibba*- tai *Lemna minor* -lajia. Myrkyllisyyden testauksessa käytettyjä limaskalajeja kuvataan lyhyesti lisäyksessä 1. Kasvimateriaali voidaan hankkia kantakokoelmasta, toisesta laboratoriosta tai luonnosta. Jos kasvit kerätään luonnosta, niitä on viljeltävä testissä käytettävässä viljelyaineessa vähintään kahdeksan viikkoa ennen käyttöä. Paikoissa, joista alkuviljelmien kasvit kerätään, ei saa olla ilmeisiä kontaminaatiolähteitä. Jos kasvit hankitaan toisesta laboratoriosta tai kantakokoelmasta, niitä on viljeltävä vastaavalla tavalla kolmen viikon ajan. Kasvimateriaalin lähde sekä testauksessa käytettävät lajit ja klooni (jos tiedossa) on aina ilmoitettava.

Testissä on käytettävä monokulttuureita, joissa ei ole muita organismeja, kuten leviä tai alkueläimiä, näkyvinä epäpuhtauksina. *L. minor* -lajin terveet kasvit ovat kolonioina, joissa on 2–5 versoa, kun taas *L. gibba* -lajin terveissä kolonioissa voi olla jopa seitsemän versoa.

Testissä käytettävät kasvit on valittava huolellisesti, koska niiden laatu ja yhtenäisyys vaikuttavat merkittävästi testin tulokseen. Testissä on käytettävä nuoria, nopeasti kasvavia kasveja, joissa ei ole näkyviä vaurioita tai värimuutoksia (kloroosia). Hyvälaatuisen viljelmän tunnistaa siitä, että siinä esiintyy runsaasti vähintään kahdesta versosta koostuvia kolonioita. Jos viljelmässä on monia yksittäisiä versoja, se on merkki ympäristörasituksesta, kuten ravinteiden puutteesta, eikä testissä saa käyttää tällaisista viljelmistä peräisin olevaa kasvimateriaalia.

1.7.3 **Viljely**

Viljelmien ylläpidon helpottamiseksi (esimerkiksi silloin, kun *Lemna*-testejä ei aiota tehdä tiettynä aikana) niitä voidaan säilyttää normaalia heikommassa valaistuksessa ja alhaisemmassa lämpötilassa (4–10 °C). Viljelyä käsitellään tarkemmin lisäyksessä 2. Jos viljelmässä näkyy merkkejä levien ja muiden eliöiden aiheuttamasta kontaminaatiosta, *Lemna*-versoista on otettava osanäyte, jolle tehdään pintasterilointi, jonka jälkeen se siirretään tuoreeseen viljelyaineeseen (ks. lisäys 2). Jäljelle jäävä kontaminoitunut viljelmä on heitettävä pois.

Riittävä määrä kolonioita siirretään aseptisesti vähintään seitsemän päivää ennen testausta tuoreeseen steriiliin viljelyaineeseen, ja kolonioita viljellään 7–10 päivän ajan testiolosuhteissa.

1.7.4 **Testiviljelyaine**

Lemna minor- ja *Lemna gibba* -lajia varten suositetaan erilaisia viljelyaineita, joita kuvataan jäljempänä. On syytä harkita huolellisesti pH-puskurin lisäämistä testiviljelyaineeseen (MOPS (4-morfoliinipropaanisulfonihappo, CAS-numero: 1132-61-2; EINECS-numero: 214-478-5) *L. minor* -lajin viljelyaineeseen ja $NaHCO_3$ *L. gibba* -lajin viljelyaineeseen), jos testiviljelyaineen epäillään voivan reagoida testiaineen kanssa ja vaikuttaa sen myrkyllisyyden ilmentymiseen. Steinbergin viljelyainetta (12) voidaan käyttää, jos validiteettivaatimukset täyttyvät.

Ruotsalaisen standardin (SIS) mukaisen *Lemna*-viljelyaineen muunnosta suositetaan käytettäväksi testauksessa, jossa viljellään ja käytetään *L. minor* -lajia. Tämän viljelyaineen koostumus esitetään lisäyksessä 3.

Lisäyksessä 3 kuvattua 20X-AAP-viljelyainetta suositetaan käytettäväksi testauksessa, jossa viljellään ja käytetään *L. gibba* -lajia.

L. minor -lajille soveltuu myös lisäyksessä 3 kuvattu Steinbergin viljelyaine, mutta sitä voidaan käyttää myös *L. gibba* -lajin viljelyssä, jos validiteettivaatimukset täyttyvät.

1.7.5 **Testiliuokset**

Testiliuokset valmistetaan yleensä laimentamalla kantaliuosta. Testiaineen kantaliuokset valmistetaan tavallisesti liuottamalla testiaine viljelyaineeseen.

Testiaineen suurin testattu pitoisuus ei yleensä saa ylittää kyseisen aineen vesiliukoisuutta testiolosuhteissa. On kuitenkin huomattava, että *Lemna*-suvun lajit kelluvat pinnalla ja voivat altistua aineille, jotka kerääntyvät veden ja ilman rajapintaan (esimerkiksi huonosti veteen liukenevat tai hydrofobiset aineet taikka pinta-aktiiviset aineet). Tällaisissa olosuhteissa kasvit altistuvat muille kuin liuoksessa olevalle aineille, ja testipitoisuudet voivat testiaineen ominaisuuksista riippuen ylittää vesiliukoisuuden. Jos testiaine liukenee huonosti veteen, voi olla tarpeen valmistaa kyseisestä aineesta väkevä kantaliuos tai dispersio käyttämällä orgaanista liuotinta tai dispergointiainetta, joilla voidaan helpottaa tarkkojen testiainemäärien lisäämistä testiviljelyaineeseen sekä testiaineen dispersiota ja

liukenemista. Tällaisten aineiden käyttöä on vältettävä mahdollisimman pitkälle. Jos liuottimia tai dispergointiaineita käytetään apuna testiliuosten valmistuksessa, niistä ei saa aiheutua fytotoksisuutta. Asetoni ja dimetyyliformamidi ovat esimerkkejä yleisesti käytetyistä liuottimista, jotka eivät aiheuta fytotoksisuutta pitoisuuden ollessa enintään 100 $\mu 1 \cdot l^{-1}$. Jos liuotinta tai dispergointiainetta käytetään, sen lopullinen pitoisuus on ilmoitettava ja pidettävä mahdollisimman pienenä (≤ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$), ja liuoksen tai dispergointiaineen pitoisuuden on oltava sama kaikissa käsitellyissä ja kontrolliliuoksissa. Dispergointiaineiden käytöstä annetaan lisäohjeita kirjallisuusviitteessä (11).

1.7.6 **Testi- ja kontrolliryhmät**

Sopivat testipitoisuudet on helpompi valita, jos testiaineen myrkyllisyydestä *Lemna*-lajeille on saatavilla aiempia tietoja esimerkiksi alustavista pitoisuusalueen määrityskokeista. Lopullisessa myrkyllisyystestissä on yleensä oltava vähintään viisi testipitoisuutta, jotka muodostavat geometrisen sarjan. Testipitoisuuksien suhdeluvun ei tulisi olla suurempi kuin 3,2, mutta suurempikin suhdeluku sallitaan, jos pitoisuus-vastekäyrä on laakea. Vähemmän kuin viiden pitoisuuden käyttö on perusteltava. Jokaisesta testipitoisuudesta on tehtävä vähintään kolme toistoa.

Valittaessa testin pitoisuusaluetta (pitoisuusalueen määritystä ja/tai lopullista myrkyllisyystestiä varten) on otettava huomioon seuraavat näkökohdat:

— EC_x-pitoisuuden määrittämiseksi testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella, jotta saavutettaisiin riittävä luottamustaso. Esimerkiksi EC_{50}-pitoisuutta arvioitaessa suurimman testipitoisuuden on ylitettävä EC_{50}-arvo. Jos EC_{50}-arvo on testin pitoisuusalueen ulkopuolella, vastaavat luottamusvälit ovat suuria, jolloin voi olla mahdotonta arvioida mallin tilastollista sopivuutta.

— Jos tavoitteena on arvioida LOEC- tai NOEC-pitoisuus, pienimmän testipitoisuuden on oltava niin pieni, että kasvu ei ole merkittävästi vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Suurimman testipitoisuuden on myös oltava niin suuri, että kasvu on huomattavasti vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Muussa tapauksessa testi on toistettava käyttämällä toista pitoisuusaluetta (jollei suurin pitoisuus ole liukoisuusrajalla tai jollei se ole suurin vaadittu rajapitoisuus, esimerkiksi 100 $mg \cdot l^{-1}$).

Jokaiseen testiin on kuuluttava kontrolliryhmä, jossa ravinneliuos, versojen ja kolonioiden lukumäärä, ympäristöolosuhteet ja menettelyt ovat samat kuin testiryhmässä mutta ilman testiainetta. Jos apuna käytetään liuotinta tai dispergointiainetta, testiin on kuuluttava ylimääräinen kontrollikäsittely, jossa liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuus on sama kuin testiainetta sisältävissä astioissa. Toistoissa kontrolliastioiden (ja liuotinta käytettäessä liuotinta sisältävien astioiden) lukumäärän on oltava vähintään yhtä suuri kuin kunkin testipitoisuuden testaamiseen käytettyjen astioiden lukumäärä ja mielellään kaksinkertainen.

Jos NOEC-pitoisuutta ei tarvitse määrittää, testimenetelmää voidaan muuttaa lisäämällä pitoisuuksien määrää ja vähentämällä toistojen määrää pitoisuutta kohden. Kontrollitoistoja on kuitenkin oltava vähintään kolme.

1.7.7 **Altistus**

Koloniat, jotka koostuvat 2–4 näkyvästä versosta, siirretään siirrosviljelmästä ja jaetaan satunnaisesti koeastioihin aseptisissa olosuhteissa. Jokaisessa koeastiassa on oltava yhteensä 9–12 versoa. Versoja ja kolonioita on oltava yhtä monta kaikissa koeastioissa. Tästä testimenetelmästä saadut kokemukset ja yhteistutkimusten (ring tests) tulokset ovat osoittaneet, että jos jokaista käsittelyä kohden tehdään kolme toistoa, joissa kaikissa on aluksi 9–12 versoa, käsittelyjen välillä voidaan jo havaita kasvueroja, jotka vastaavat 4–7 prosentin inhibitiota, jos se lasketaan kasvunopeuden perusteella (ja 10–15 prosentin inhibitiota, jos se lasketaan tuotoksen perusteella) (10).

Koeastiat on sijoitettava inkubaattoriin satunnaistetusti, jotta valon voimakkuuden ja lämpötilan spatiaalisista eroista johtuvat vaikutukset olisivat mahdollisimman pienet. Vaatimuksena on myös, että jokaisella havainnointikerralla käytetään lohkoittaista järjestystä tai astioiden satunnaistettua uudelleensijoittelua (joka voidaan tehdä useamminkin).

Jos alustava stabiiliustesti osoittaa, että testiaineen pitoisuutta ei voida pitää yllä testin ajan eli 7 päivää (toisin sanoen mitattu pitoisuus vähenee alle 80 prosenttiin mitatusta alkupitoisuudesta), on suositeltavaa käyttää semistaattista testijärjestelmää. Siinä tapauksessa koloniat on altistettava vasta valmistetuille testi- ja kontrolliliuoksille ainakin kahdesti testin aikana (esimerkiksi päivinä 3 ja 5). Testiaineen stabiiliudesta riippuu, kuinka usein koloniat on altistettava vastavalmistetulle viljelyaineelle. Testattaessa hyvin epästabiileja tai haihtuvia aineita pitoisuuksien pitäminen lähes vakioina voi vaatia useampia altistuskertoja. Joissakin tapauksissa voi olla tarpeen käyttää läpivirtausmenetelmää (11)(13).

Tähän testimenetelmään ei kuulu versojen altistaminen ruiskuttamalla, mutta sitä käsitellään kirjallisuusviitteessä (14).

1.7.8 **Inkubaatio-olosuhteet**

Testissä käytetään tasaista lämpimän- tai kylmänvalkoista loistevaloa, jotta valon voimakkuudeksi saadaan 85–135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, kun se mitataan fotosyynteesille suotuisalla aallonpituusalueella (400–700 nm) pisteissä, jotka ovat samalla etäisyydellä valolähteestä kuin *Lemna*-versot (tämä vastaa voimakkuusaluetta 6 500–10 000 luksia). Valon voimakkuus ei saa vaihdella enempää kuin ± 15 prosenttia testialueen yläpuolella. Valoilmaisin- ja valonmittausmenetelmä ja erityisesti anturityyppi vaikuttavat mittausarvoon. Pallomaiset anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason ylä- ja alapuolelta) ja kosinikorjaimella varustetut anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason yläpuolelta) ovat suositeltavampia kuin yksisuuntaiset anturit. Ensin mainitut antavat suurempia lukemia mitattaessa tässä kuvatun kaltaista monipisteistä valonlähdettä.

Lämpötilan on oltava koeastioissa 24 ± 2 °C. Yleensä kontrolliviljelyaineen pH-arvo saa kokeen aikana vaihdella enintään 1,5 yksikön verran. Tätä suurempi poikkeama ei kuitenkaan mitätöi testiä, jos validiteettivaatimusten voidaan osoittaa täyttyvän. Erityistapauksissa, esimerkiksi testattaessa epästabiileja aineita tai metalleja, on kiinnitettävä erityistä huomiota pH:n vaihteluun. Tästä annetaan lisäohjeita kirjallisuusviitteessä (11).

1.7.9 **Kesto**

Testi päättyy seitsemän päivän kuluttua kasvien siirtämisestä koeastioihin.

1.7.10 **Mittaukset ja analyyttiset määritykset**

Testin alussa lasketaan ja kirjataan koeastioissa olevien versojen lukumäärä. Tällöin on laskettava kaikki esiin työntyvät ja selvästi näkyvät versot. Normaaleilta ja epänormaaleilta vaikuttavien versojen määrä lasketaan testin alussa, vähintään joka kolmas päivä altistuksen aikana (eli ainakin kaksi kertaa seitsemän päivän jakson aikana) sekä kokeen päättyessä. Kasvien kehityksessä tapahtuvat muutokset rekisteröidään. Niitä ovat esimerkiksi versojen koossa ja ulkonäössä tapahtuvat muutokset, merkit nekroosista, kloroosista tai kupruisuudesta, kolonian hajoaminen tai kelluvuuden heikkeneminen sekä muutokset juurien pituudessa ja ulkonäössä. Lisäksi on rekisteröitävä testiviljelyaineen erityiset ominaisuudet (esimerkiksi liukenemattoman materiaalin esiintyminen ja levien kasvu koeastiassa).

Versojen lukumäärän laskemisen lisäksi testin aikana arvioidaan myös testiaineen vaikutuksia yhteen (tai useampaan) seuraavista mittausmuuttujista:

i) versojen kokonaispinta-ala;

ii) kuivapaino;

iii) tuorepaino.

Versojen kokonaispinta-alaan liittyy se etu, että se voidaan määrittää jokaisesta testi- ja kontrolliastiasta testin alussa, sen aikana ja sen lopussa. Kuiva- tai tuorepaino on määritettävä testin alussa siirrosviljelmästä otetusta näytteestä, jonka on oltava edustava näyte testin käynnistämiseen käytetystä materiaalista, sekä testin lopussa jokaisesta testi- ja kontrolliastiasta otetusta kasvimateriaalista. Jos versojen pinta-alaa ei mitata, on parempi mitata kuivapaino tuorepainon sijasta.

Versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino ja tuorepaino voidaan määrittää seuraavasti:

i) *Versojen kokonaispinta-ala*: Kaikkien kolonioiden versojen kokonaispinta-ala voidaan määrittää kuva-analyysillä. Koeastiasta ja kasveista voidaan ottaa siluettikuva videokameralla (esimerkiksi sijoittamalla koeastia valolaatikon päälle), ja näin saatu kuva digitalisoidaan. Koeastiassa olevien versojen kokonaispinta-ala voidaan määrittää tekemällä kalibrointi tunnetun pinta-alan tasokuvioiden avulla. Tällöin on huolehdittava siitä, että koeastian reunan aiheuttamat vaikutukset eivät vääristä määritystä. Vaihtoehtoisena mutta työläämpänä menetelmänä on valokuvata koeastiat ja kasvit, leikata näin saatu kolonioiden siluetti ja määrittää niiden pinta-ala käyttämällä lehtialan analysaattoria. Muutkin tekniikat voivat olla käyttökelpoisia (esimerkiksi kolonioiden siluetin pinta-alan ja tietyn pinta-alayksikön välinen painosuhde paperin painon mukaan laskettuna).

ii) *Kuivapaino*: Jokaisesta koeastiasta kerätään kaikki koloniat, jotka huuhdotaan tislatulla tai deionisoidulla vedellä. Kolonioissa oleva ylimääräinen vesi imeytetään paperiin, minkä jälkeen niitä kuivataan 60 °C:ssa, kunnes niiden paino on vakio. Juurenpalaset on otettava mukaan. Kuivapaino on ilmoitettava vähintään 0,1 mg:n tarkkuudella.

iii) *Tuorepaino*: Kaikki koloniat siirretään ennalta punnittuihin polystyreeniputkiin (tai muihin inerttiä materiaalia oleviin putkiin), joiden pyöreissä pohjissa on pieniä (1 mm) aukkoja. Putkia sentrifugoidaan kierrosluvulla 3 000 rpm huoneenlämmössä 10 minuutin ajan. Putket, jotka sisältävät näin kuivatut koloniat, punnitaan uudelleen, ja tuorepaino lasketaan vähentämällä punnitustuloksesta tyhjän putken paino.

1.7.10.1 *Mittausten ja analyyttisten määritysten tiheys*

Käytettäessä staattista testimenetelmää kunkin käsittelyn liuoksen pH on mitattava testin alussa ja lopussa. Jos testimenetelmä on semistaattinen, pH on mitattava jokaisesta erästä ”tuoretta” testiliuosta ennen kutakin vaihtoa ja myös vastaavista ”käytetyistä” liuoksista.

Valon voimakkuus kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa on mitattava pisteistä, jotka ovat samalla etäisyydellä valolähteestä kuin *Lemna*-versot. Mittaukset on tehtävä ainakin kerran testin aikana. Viljelyaineen lämpötila surrogaattiastiassa, jota säilytetään kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa samoissa olosuhteissa, on mitattava vähintään kerran päivässä.

Testiaineen pitoisuudet määritetään testin aikana sopivin väliajoin. Staattisissa testeissä vähimmäisvaatimuksena on määrittää pitoisuudet testin alussa ja lopussa.

Semistaattisissa testeissä, joissa testiaineen pitoisuuden ei oleteta pysyvän ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, on analysoitava kaikki vastavalmistetut testiliuokset ja samat liuokset käytettyinä kunkin vaihdon yhteydessä (ks. 1.7.7 kohdan kolmas kappale). Kuitenkin niissä testeissä, joissa testiaineen mitattu alkupitoisuus ei ole ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, mutta joissa voidaan antaa riittävä näyttö siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavissa ja stabiileja (toisin sanoen 80–120 prosenttia alkupitoisuudesta), kemialliset määritykset voidaan tehdä ainoastaan suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista. Kaikissa tapauksissa on testiaineen pitoisuudet ennen vaihtoa määritettävä vain yhdestä toistossa käytetystä astiasta (tai kaikkien toistoissa käytettyjen astioiden yhdistetystä sisällöstä) kutakin testipitoisuutta kohden.

Läpivirtaustestissä voidaan käyttää samanlaista näytteenottomenettelyä kuin semistaattisessa testissä ja tehdä analyysi testin alussa, puolivälissä ja lopussa, mutta ”käytettyjen” liuosten mittaaminen ei ole aiheellista. Tämäntyyppisessä testissä laimenteen ja testiaineen tai testiaineen kantaliuoksen virtausnopeus on tarkistettava päivittäin.

Jos on näyttöä siitä, että testattavan aineen pitoisuus on pysynyt tyydyttävästi ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten analysointi voi perustua nimellispitoisuuksiin tai mitattuihin alkupitoisuuksiin. Jos pitoisuus poikkeaa enemmän kuin ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta, tulosten analysoinnin on perustuttava pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon altistuksen aikana tai malleihin, jotka kuvaavat testiaineen pitoisuuden vähenemistä (11).

1.7.11 **Rajatesti**

Joissakin tapauksissa, esimerkiksi silloin, kun alustava testi osoittaa, että testiaineella ei ole myrkkyvaikutuksia pitoisuusarvoon 100 $mg \cdot l^{-1}$ saakka tai siihen liukoisuusrajaan asti, joka testiaineella on testiviljelyaineessa (sen mukaan, kumpi näistä on pienempi), voidaan tehdä rajatesti, jossa verrataan yhden kontrolliryhmän ja yhden käsitellyn ryhmän vasteita (pitoisuudessa 100 $mg \cdot l^{-1}$ tai liukoisuusrajaa vastaavassa pitoisuudessa). On erittäin suotavaa analysoida altistuspitoisuus rajatestin tueksi. Kaikki edellä kuvatut testiolosuhteet ja validiteettivaatimukset koskevat myös rajatestiä, lukuun ottamatta käsiteltyjen toistojen määrää, joka on kaksinkertaistettava. Kontrolli- ja käsitellyssä ryhmässä tapahtunutta kasvua voidaan analysoida Studentin t-testin kaltaisella tilastotutkimuksella, jossa verrataan keskiarvoja.

2. TIEDOT JA NIIDEN RAPORTOIMINEN

2.1 KAKSINKERTAISTUMISAIKA

Seuraavan kaavan avulla, jota sovelletaan kontrolliastioita koskeviin tietoihin, voidaan määrittää versojen lukumäärän kaksinkertaistumisaika (T_d) ja varmistaa samalla, että testi täyttää tämän validiteettivaatimuksen (kohta 1.6):

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

Kaavassa μ on keskimääräinen spesifinen kasvunopeus, joka lasketaan kohdan 2.2.1 ensimmäisessä ja toisessa kappaleessa kuvatulla tavalla.

2.2 VASTEMUUTTUJAT

Testin tarkoituksena on määrittää testattavan aineen vaikutukset *Lemna*n kasvuun. Tässä testimenetelmässä kuvataan kahta eri vastemuuttujaa, koska jäsenvaltiot suosivat erilaisia käytänteitä ja asettavat erilaisia sääntelyvaatimuksia. Jotta testitulokset voitaisiin hyväksyä kaikissa jäsenvaltioissa, vaikutuksia olisi arvioitava käyttämällä molempia vastemuuttujia a ja b, joita kuvataan jäljempänä.

a) Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus: Tämä vastemuuttuja lasketaan kontrolleista ja kustakin käsitellystä ryhmästä seuraavien kahden muuttujan avulla: versojen lukumäärän logaritmiarvossa tietyn (päivinä ilmaistun) ajan kuluessa tapahtunut muutos ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispinta-alan, kuivapainon tai tuorepainon) logaritmiarvossa tietyn (päivinä ilmaistun) ajan kuluessa tapahtunut muutos. Tätä kasvunopeutta kutsutaan joskus suhteelliseksi kasvunopeudeksi (15).

b) Tuotos: Tämä vastemuuttuja lasketaan seuraavien kahden muuttujan avulla: versojen lukumäärän muutokset ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispinta-alan, kuivapainon tai tuorepainon) muutokset kontrolleissa ja kussakin käsitellyssä ryhmässä testin loppuun saakka.

On syytä huomata, että näiden kahden vastemuuttujan avulla lasketut myrkyllisyysarvot eivät ole vertailukelpoisia, mikä on otettava huomioon käytettäessä testin tuloksia. Jos testiolosuhteet ovat tämän testimenetelmän mukaiset, keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen perustuvat EC_x-arvot (E_rC_x) ovat yleensä suurempia kuin tuotokseen perustuvat arvot (E_yC_x), mikä johtuu niiden matemaattisista perusteista. Tätä ei pidä tulkita siten, että näiden kahden vastemuuttujan herkkyydet olisivat erilaiset, vaan arvojen välinen ero on puhtaasti matemaattinen. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus perustuu yleiseen kasvumalliin, joka kuvaa limaskan eksponentiaalista kasvua rajoittamattomissa viljelmissä, joista toksisuus arvioidaan kasvunopeuteen kohdistuvien vaikutusten perusteella ottamatta huomioon kontrollin spesifisen kasvunopeuden absoluuttista tasoa, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuutta tai testin kestoa. Tuotosta kuvaavaan vastemuuttujaan perustuvat tulokset riippuvat sen sijaan kaikista näistä muista muuttujista. E_yC_x riippuu kussakin testissä käytetyn limaskalajin spesifisestä kasvunopeudesta ja suurimmasta spesifisestä kasvunopeudesta, joka voi vaihdella eri lajien ja jopa eri kloonien välillä. Tätä vastemuuttujaa ei saa käyttää vertailtaessa eri limaskalajien tai eri kloonienkaan herkkyyttä myrkyllisille aineille. Vaikka tieteen kannalta on parempi arvioida myrkyllisyyttä keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden perusteella, tähän testimenetelmään on otettu mukaan myös tuotokseen perustuvat myrkyllisyyden arvioinnit, jotta voidaan täyttää eräiden maiden nykyiset sääntelyvaatimukset.

Myrkyllisyyden arviointien on perustuttava sekä versojen lukumäärään että johonkin toiseen mittausmuuttujaan (versojen kokonaispinta-alaan, kuivapainoon tai tuorepainoon), koska eräät aineet voivat vaikuttaa enemmän muihin mittausmuuttujiin kuin versojen lukumäärään. Tätä vaikutusta ei havaittaisi laskemalla pelkästään versojen lukumäärä.

Versojen lukumäärä ja muut kirjatut mittausmuuttujat (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino) esitetään taulukkona, josta ilmenevät myös testiaineen pitoisuudet kussakin mittauksessa. Kun tietoja analysoidaan myöhemmin esimerkiksi LOEC-, NOEC- tai EC_x-pitoisuuden arvioimiseksi, analyysin perustana on käytettävä yksittäisistä toistoista saatuja arvoja eikä kunkin käsitellyn ryhmän laskettuja keskiarvoja.

2.2.1 **Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus**

Tietyn ajanjakson keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan kasvumuuttujien – versojen lukumäärän ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispinta-alan, kuivapainon tai tuorepainon) – logaritmisena kasvuna soveltamalla seuraavaa kaavaa kaikkiin kontrolliliuosten ja käsiteltyjen liuosten toistoihin:

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

jossa

— μ_{i-j} = keskimääräinen spesifinen kasvunopeus aikavälillä i–j

— N_i = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä i

— N_j = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä j

— t = aikaväli i–j.

Kullekin käsittely- ja kontrolliryhmälle lasketaan kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus on laskettava koko testijaksolta (edellä olevassa kaavassa hetki "i" tarkoittaa testin alkua ja hetki "j" testin päättymistä). Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen. Sen lisäksi on määritettävä jaksoittaiset kasvunopeudet, jotta voidaan arvioida testiaineen vaikutuksia koko altistusaikana (esimerkiksi analysoimalla logaritmisia kasvukäyriä). Merkittävät erot jaksoittaisen kasvunopeuden ja keskimääräisen kasvunopeuden välillä osoittavat, että kasvu poikkeaa jatkuvasta eksponentiaalisesta kasvusta, jolloin kasvukäyriä on syytä tarkastella lähemmin. Siinä tapauksessa varovaisena lähestymistapana on verrata käsiteltyjen viljelmien spesifisiä kasvunopeuksia suurimman kasvunestymisen aikana kontrollien vastaaviin kasvunopeuksiin samana aikana.

Kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen (I_r) voidaan sen jälkeen laskea kutakin testipitoisuutta varten (käsittelyryhmässä) seuraavan kaavan avulla:

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

jossa

— $\%I_r$ = keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen

— μ_C = μ:n keskiarvo kontrolliryhmässä

— μ_T = μ:n keskiarvo käsittelyryhmässä.

2.2.2 **Tuotos**

Tuotokseen kohdistuvat vaikutukset määritetään seuraavien kahden mittausmuuttujan avulla: versojen lukumäärä ja jokin toinen mittausmuuttuja (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino), joka mitataan jokaisesta koeastiasta testin alussa ja lopussa. Jos toisena mittausmuuttujana käytetään kuivapainoa tai tuorepainoa, testin alussa oleva biomassa määritetään samasta erästä otetun versonäytteen avulla, jota on käytetty koeastioiden siirrostamiseen (ks. kohdan 1.7.3 toinen kappale). Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan tuotoksen

keskiarvo varianssiestimaatteineen. Tuotoksen prosentuaalinen estyminen (% I_y) voidaan laskea kutakin käsittelyryhmää varten seuraavasti:

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

jossa

— % I_y = tuotoksen prosentuaalinen estyminen

— b_C = kontrolliryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa

— b_C = käsittelyryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa.

2.2.3 **Pitoisuus-vastekäyrien piirtäminen**

Pitoisuus-vastekäyrät piirretään merkitsemällä y-akselille vastemuuttujan keskimääräinen prosentuaalinen estyminen (vastemuuttujana on I_r tai I_y, joka lasketaan 2.2.1 kohdan viimeisen kappaleen tai 2.2.2 kohdan mukaan) ja x-akselille testiaineen pitoisuuden logaritmi.

2.2.4 **EC_x-pitoisuuden arviointi**

EC_x-pitoisuuden estimaattien (esimerkiksi EC_{50}-arvon) on perustuttava sekä keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen (E_rC_x) että tuotokseen (E_yC_x). Näistä kummankin on puolestaan perustuttava versojen lukumäärään ja johonkin toiseen mittausmuuttujaan (versojen kokonaispinta-alaan, kuivapainoon tai tuorepainoon), koska eräät testiaineet vaikuttavat eri tavalla versojen lukumäärään kuin muihin mittausmuuttujiin. Tavoitteena on siis saada myrkyllisyysparametreiksi seuraavat neljä EC_x-arvoa kutakin laskettua kasvunestymistasoa x kohden: E_rC_x (versojen lukumäärä); E_rC_x (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino); E_yC_x (versojen lukumäärä) ja E_yC_x (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino).

2.3 TILASTOMENETELMÄT

Tavoitteena on saada kvantitatiivinen pitoisuus-vastesuhde regressioanalyysin avulla. Painotettua lineaarista regressiota voidaan käyttää sen jälkeen, kun vastetiedoille on tehty linearisoiva muunnos – esimerkiksi probitti-, logitti- tai Weibull-yksiköiksi (16) – mutta suositeltavampaa on käyttää epälineaarisia regressiomenetelmiä, joilla voidaan paremmin käsitellä tiedoissa väistämättä esiintyviä epäsäännöllisyyksiä sekä poikkeamia tasaisista jakaumista. Lähestyttäessä tilaa, jossa kasvu ei esty ollenkaan tai estyminen on täydellistä, linearisoiva muunnos voi suurentaa epäsäännöllisyyksiä ja haitata siten analyysiä (16). On syytä huomata, että standardianalyysimenetelmät, joissa käytetään probitti-, logitti- tai Weibull-muunnoksia, on tarkoitettu dikotomisia tietoja varten (kun vasteita on kaksi, esimerkiksi kuolleisuus tai eloonjääminen), minkä vuoksi niitä on mukautettava, jos niitä aiotaan käyttää kasvu- tai tuotostietojen analysointiin. Kirjallisuusviitteissä (17), (18) ja (19) kuvataan erityismenetelmiä, joilla EC_x-arvot voidaan määrittää jatkuvista tiedoista.

Kunkin vastemuuttujan analysoimiseksi käytetään pitoisuus-vastesuhdetta, jonka avulla lasketaan EC_x-arvojen piste-estimaatit. Jokaiselle estimaatille on määritettävä 95 prosentin luottamusväli, jos se on mahdollista. Vastetietojen ja regressiomallin välinen yhteensopivuuden aste on arvioitava joko graafisesti tai tilastollisesti. Regressionanalyysi on tehtävä käyttämällä yksittäisiä toistojen vasteita eikä käsittelyryhmien keskiarvoja.

EC_{50}-estimaatit ja luottamusvälit saadaan myös käyttämällä lineaarista interpolointia bootstrap-menetelmän kanssa (20), jos käytettävissä olevat regressiomallit tai -menetelmät eivät sovellu kyseisten tietojen käsittelyyn.

LOEC-pitoisuuden ja siten myös NOEC-pitoisuuden arvioimiseksi on verrattava käsiteltyjen liuosten keskiarvoja käyttämällä varianssianalyysitekniikoita (ANOVA). Sen jälkeen on verrattava kunkin pitoisuuden keskiarvoa kontrolliryhmän keskiarvoon käyttämällä sopivaa moniulotteista vertailumenetelmää tai trenditestimenetelmää. Dunnettin tai Williamsin testi voi olla käyttökelpoinen (21)(22)(23)(24). Lisäksi on arvioitava, pitääkö ANOVA-oletus varianssin homogeenisuudesta paikkansa. Arviointi voidaan tehdä graafisesti tai virallisen testin avulla (25). Sopivia testejä ovat Levenen ja Bartlettin testit. Jos oletus varianssin homogeenisuudesta ei pidä paikkaansa, tilanne on joskus korjattavissa tietojen logaritmimuunnoksella. Jos varianssin heterogeenisuus on erittäin suuri eikä se ole korjattavissa muunnoksella, on harkittava analysointia sellaisilla menetelmillä kuin Jonckheeren alaspäin askeltava trenditesti. Kirjallisuusviitteessä (19) annetaan lisäohjeita NOEC-arvon määrittämisestä.

Tieteen viimeaikaisen kehityksen perusteella on suositeltu, että NOEC-käsitteestä luovuttaisiin ja se korvattaisiin regressioanalyysiin perustuvilla EC_x:n piste-estimaateilla. Sopivaa x:n arvoa ei ole vielä vahvistettu tätä *Lemna*-testiä varten. Sopivalta vaikuttaisi väli 10–20 prosenttia (valitun vastemuuttujan mukaan), ja on suositeltavaa ilmoittaa sekä EC_{10}- että EC_{20}-arvo.

3. RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, mukaan luettuna vesiliukoisuuden raja-arvo,

— kemialliset tunnistetiedot (esimerkiksi CAS-numero), mukaan luettuna puhtaus.

Koelajit:

— tieteellinen nimi, klooni (jos tiedossa) ja alkuperä.

Testiolosuhteet:

— testauksessa käytetty menetelmä (staattinen, semistaattinen tai läpivirtausmenetelmä),

— testin alkamispäivä ja kesto,

— testiviljelyaine,

— koejärjestely: koeastiat ja niiden sulkimet, liuostilavuudet, kolonioiden ja versojen lukumäärä koeastiaa kohden testin alussa,

— testipitoisuudet (nimellis- ja mitatut pitoisuudet tapauksen mukaan) sekä toistojen määrä pitoisuutta kohden,

— kanta- ja testiliuosten valmistusmenetelmät, mukaan luettuina tiedot mahdollisesta liuottimen tai dispergointiaineen käytöstä,

— lämpötila testin aikana,

— valolähde, valon voimakkuus ja homogeenisuus,

— testi- ja kontrolliviljelyaineen pH-arvot,

— testiaineen pitoisuudet ja analyysimenetelmä sekä laadunarviointiin tarvittavat tiedot (validointitutkimukset, analyysien keskihajonnat ja luottamusvälit),

— versojen lukumäärän ja muiden mittausmuuttujien, kuten kuivapainon, tuorepainon tai versojen kokonaispinta-alan, määritysmenetelmät,

— kaikki poikkeamat tästä testimenetelmästä.

Tulokset:

— raakatiedot: versojen lukumäärä ja muut mittausmuuttujat jokaisessa testaukseen ja toistoihin käytetyssä koeastiassa kullakin havainnointi- ja analysointikerralla,

— kunkin mittausmuuttujan keskiarvot ja keskihajonnat,

— kutakin pitoisuutta vastaavat kasvukäyrät (suosituksena on käyttää mittausmuuttujan logaritmimuunnosta, ks. 2.2.1 kohdan toinen kappale),

— kaksinkertaistumisaika/kasvunopeus kontrollissa versojen lukumäärän avulla laskettuna,

— kunkin käsitellyn toiston lasketut vastemuuttujat sekä toistojen keskiarvot ja variaatiokerroin,

— pitoisuuden ja vaikutuksen välisen suhteen graafinen esitys,

— myrkyllisyysarvioinnin päätepisteiden estimaatit vastemuuttujien osalta, esimerkiksi EC_{50}, EC_{10} ja EC_{20}, ja vastaavat luottamusvälit; LOEC- ja/tai NOEC-pitoisuus, jos ne on laskettu, ja niiden määrityksessä käytetyt tilastomenetelmät,

— jos on käytetty ANOVA-analyysiä, havaittavissa olevan vaikutuksen suuruus (esimerkiksi vähiten merkitsevä erotus),

— mahdollinen kasvun edistyminen käsittelyissä liuoksissa,

— näkyvät merkit fytotoksisuudesta ja testiliuoksia koskevat havainnot,

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

4. **KIRJALLISUUS**

(1) OECD TG 221 (2006) *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test.

(2) The use of *Lemna* studies for coloured substances is detailed in Section 13.5.3 of the EU Manual of Decisions dated July 2006, at http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals.

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment – Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, available at

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A.

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

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

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

(7) SIS – Svenska standardiseringsinstitutet (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten *Lemna minor*, andmat. SS 02 82 13. 15 s.

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

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

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

(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

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

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

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

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

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

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

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

(19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

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

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

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

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

(24) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

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

Lisäys 1

Lemna spp:n kuvaus

Limaskaksi yleisesti kutsuttu vesikasvi *Lemna* spp. kuuluu *Lemnaceae*-heimoon. Siihen kuuluu neljä sukua, joiden lajeja esiintyy kaikkialla maailmassa. Niiden erilaisia ulkomuotoja ja taksonomiaa on käsitelty perusteellisesti kirjallisuusviitteissä (1)(2). *Lemna gibba* ja *Lemna minor* ovat lauhkean vyöhykkeen alueille luonteenomaisia lajeja. Niitä käytetään yleisesti myrkyllisyystesteissä. Molemmilla lajeilla on kelluva tai vedenalainen levymäinen verso, ja kunkin verson alapinnan keskiosasta lähtee hyvin ohut juuri. *Lemna* spp. kukkii hyvin harvoin ja lisääntyy kasvullisesti tuottamalla uusia versoja (3). Nuoremmat kasvit ovat vanhempiin kasveihin verrattuna yleensä vaaleampia, niillä on lyhyemmät juuret ja niissä on kaksi tai kolme erikokoista versoa. *Lemna*-suvun kasvit sopivat erittäin hyvin laboratoriokokeisiin pienen kokonsa, yksinkertaisen rakenteensa, suvuttoman lisääntymisensä ja lyhyen generaatioaikansa ansiosta (4)(5).

Koska kasvien herkkyys luultavasti vaihtelee lajista toiseen, herkkyyttä vertailtaessa hyväksytään ainoastaan lajin sisäiset vertailut.

Kirjallisuutta: esimerkkejä testauksessa käytetyistä *Lemna*-lajeista:

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

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

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

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

SIS – Svenska standardiseringsinstitutet (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten *Lemna minor*, andmat. SS 02 82 13. 15 s.

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (hyväksytty uudelleen vuonna 1998). S. 733–742.

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

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

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

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

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

***Lemna*-lajien hankintalähteitä**

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Puhelin: +1-416-978-3641
Faksi:+1-416-978-5878
Sähköposti: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

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

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 Stockholm
Sweden
Puhelin: +46 8 674 7240
Faksi: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Germany
Sähköposti: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Kirjallisuus

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

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

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

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

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

Lisäys 2

Kantaviljelmän ylläpito

Kantaviljelmiä voidaan säilyttää alhaisissa lämpötiloissa (4–10 °C) suhteellisen pitkiä aikoja käynnistämättä niitä uudelleen. *Lemna*-kasvien viljelyaine voi olla sama kuin testauksessa käytetty viljelyaine, mutta kantaviljelmissä voidaan käyttää myös muita ravinteikkaita viljelyaineita.

Joukko nuoria, vaaleanvihreitä kasveja siirretään säännöllisesti aseptisella menetelmällä uusiin, tuoretta viljelyainetta sisältäviin viljelyastioihin. Jatkoviljelmiä voidaan käynnistää jopa kolmen kuukauden väliajoin tässä liitteessä ehdotetuissa viileissä olosuhteissa.

Kasveja viljeltäessä on käytettävä kemiallisesti puhtaita (happopestyjä) ja steriilejä lasisia kasvatusastioita sekä aseptisia käsittelytekniikoita. Jos esimerkiksi levät tai sienet kontaminoivat kantaviljelmän, on ryhdyttävä toimiin näiden eliöiden poistamiseksi. Levät ja useimmat muut kontaminoivat eliöt voidaan poistaa pintasteriloinnilla. Kontaminoituneesta kasvimateriaalista otetaan näyte, ja juuret leikataan pois. Materiaalia ravistellaan puhtaassa vedessä voimakkaasti, minkä jälkeen se upotetaan 0,5 tilavuusprosentin natriumhypokloriittiliuokseen, jossa sitä pidetään 30 sekunnista 5 minuuttiin. Sen jälkeen kasvimateriaali huuhdellaan steriilillä vedellä ja siirretään erinä tuoretta viljelyainetta sisältäviin kasvatusastioihin. Monet versot kuolevat tämän käsittelyn jälkeen varsinkin, jos altistusajat ovat pitkiä, mutta osa eloon jäävistä versoista on yleensä vapautunut kontaminaatiosta. Näitä versoja voidaan käyttää uusien viljelmien siirrostamiseen.

Lisäys 3

Viljelyaine

L. minor- ja *L. gibba* -lajin viljelyyn suositellaan eri viljelyaineita. *L. minor* -lajin viljelyyn suositellaan ruotsalaisen standardin (SIS) mukaisen viljelyaineen muunnosta, kun taas *L. gibba* -lajin viljelyyn suositellaan 20X-AAP-viljelyainetta. Kummankin viljelyaineen koostumus esitetään jäljempänä. Näitä viljelyaineita valmistettaessa on käytettävä reagenssi- tai analyysilaatua olevia kemikaaleja ja deionisoitua vettä.

Ruotsalaisen standardin (SIS) mukainen viljelyaine Lemnan viljelyä varten

— Kantaliuokset I–V steriloidaan autoklaavikäsittelyllä (120 °C, 15 minuuttia) tai kalvosuodatuksella (huokoskoko noin 0,2 µm).

— Kantaliuos VI (ja valinnaisesti kantaliuos VII) voidaan steriloida vain kalvosuodatuksella; näitä liuoksia ei saa autoklavoida.

— Steriilejä kantaliuoksia säilytetään viileässä ja pimeässä. Kantaliuokset I–V on heitettävä pois kuuden kuukauden kuluttua. Kantaliuosta VI (ja valinnaista kantaliuosta VII) voidaan säilyttää yhden kuukauden ajan.

Kantaliuoksen numero	Aine	Pitoisuus kantaliuoksessa ($g \cdot l^{-1}$)	Pitoisuus valmistetussa viljelyaineessa ($mg \cdot l^{-1}$)	Valmistettu viljelyaine	
				Alkuaine	Pitoisuus ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (puskuri)	490	490	—	—

— Yksi litra SIS-viljelyainetta valmistetaan lisäämällä seuraavat aineet 900 ml:aan deionisoitua vettä:

  — 10 ml kantaliuosta I

  — 5 ml kantaliuosta II

  — 5 ml kantaliuosta III

  — 5 ml kantaliuosta IV

  — 1 ml kantaliuosta V

  — 5 ml kantaliuosta VI

  — 1 ml kantaliuosta VII (valinnaisesti).

Huomautus: Eräitä testiaineita varten voidaan tarvita ylimääräistä kantaliuosta VII (MOPS-puskuria) (ks. 1.4 kohdan viimeinen kappale).

— Viljelyaineen pH säädetään arvoon 6,5 ± 0,2 käyttämällä 0,1 tai 1 mol HCl:a tai NaOH:a, minkä jälkeen lisätään deionisoitua vettä, kunnes tilavuus on yksi litra.

20X-AAP-viljelyaine

Kantaliuokset valmistetaan steriiliin tislattuun tai deionisoituun veteen.

Steriilejä kantaliuoksia säilytetään viileässä ja pimeässä. Tällaisissa olosuhteissa kantaliuokset säilyvät ainakin 6–8 viikkoa.

20X-AAP-viljelyainetta varten valmistetaan viisi ravinnepitoista kantaliuosta (A1, A2, A3, B ja C) käyttämällä reagenssilaatua olevia kemikaaleja. Viljelyaineen valmistamiseksi lisätään 20 ml kutakin ravinnepitoista kantaliuosta noin 850 ml:aan deionisoitua vettä. Viljelyaineen pH säädetään arvoon 7,5 ± 0,1 käyttämällä 0,1 tai 1 mol HCl:a tai NaOH:a, minkä jälkeen lisätään deionisoitua vettä, kunnes tilavuus on yksi litra. Sen jälkeen viljelyaine suodatetaan steriiliin astiaan kalvosuodattimen läpi, jonka huokoskoko on noin 0,2 µm.

Testauksessa käytettävä viljelyaine on valmistettava 1–2 päivää ennen käyttöä, jotta pH stabiloituisi. Viljelyaineen pH on tarkistettava ennen käyttöä ja tarvittaessa säädettävä uudelleen lisäämällä 0,1 tai 1 M NaOH:a tai HCl:a, kuten edellä on kuvattu.

Kantaliuoksen numero	Aine	Pitoisuus kantaliuoksessa ($g \cdot l^{-1}$) (*)	Pitoisuus valmistetussa viljelyaineessa ($mg \cdot l^{-1}$) (*)	Valmistettu viljelyaine	
				Alkuaine	Pitoisuus ($mg \cdot l^{-1}$) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Jollei toisin ilmoiteta.

Alaviite: Teoreettisesti sopiva lopullinen bikarbonaattipitoisuus (jossa pH:ta ei tarvitse säätää kovin paljon) on 15 mg/l (ei siis 300 mg/l). 20X-AAP-viljelyaineen aiemmassa käytössä, muun muassa tätä testimenetelmää koskevassa yhteistutkimuksessa, bikarbonaattipitoisuus on kuitenkin ollut 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

Steinbergin viljelyaine (ISO 20079 -standardin mukaan)

Pitoisuudet ja kantaliuokset

— Muutettua Steinbergin viljelyainetta käytetään ISO 20079 -standardissa ainoastaan *Lemna minor* -lajin viljelyyn (koska standardissa ei sallita muita lajeja), mutta testit ovat osoittaneet, että sillä voidaan saada hyviä tuloksia myös *Lemna gibba* -lajin viljelyssä.

— Viljelyainetta valmistettaessa on käytettävä reagenssi- tai analyysilaatua olevia kemikaaleja ja deionisoitua vettä.

— Ravinneliuos valmistetaan kantaliuoksesta tai 10 kertaa väkevämmästä viljelyaineesta, jolloin liuoksen pitoisuus saadaan mahdollisimman suureksi ilman saostumista.

Taulukko 1

pH-stabiloitu Steinbergin viljelyaine (muutettu Altenburgerin mukaan)

Aine		Ravinneliuos	
Makroravinteet	moolipaino	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Mikroravinteet	moolipaino	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA-dinatriumdihydraatti	372,24	1 500,00	4,03

Taulukko 2

Kantaliuokset (makroravinteet)

1. **Makroravinteet (50-kertainen väkevöinti)**	g/l
Kantaliuos 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Kantaliuos 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Kantaliuos 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Taulukko 3

Kantaliuokset (mikroravinteet)

2. **Mikroravinteet (1 000-kertainen väkevöinti)**	mg/l
Kantaliuos 4:	
H_3BO_3	120,0
Kantaliuos 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Kantaliuos 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Kantaliuos 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Kantaliuos 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA-dinatriumdihydraatti	1 500,00

— Kantaliuokset 2 ja 3 voidaan yhdistää, samoin kuin kantaliuokset 4–7 (ottaen samalla huomioon vaaditut pitoisuudet).

— Jotta kantaliuokset säilyisivät pitempään, ne voidaan autoklavoida 121 °C:ssa 20 minuutin ajan tai niille voidaan tehdä steriili suodatus (huokoskoko 0,2 μm). Kantaliuoksen 8 steriili suodatus (huokoskoko 0,2 μm) on erittäin suositeltavaa.

Steinbergin (muutetun) viljelyaineen lopullisen pitoisuuden valmistaminen

— Lisätään 20 ml kantaliuoksia 1, 2 ja 3 (ks. taulukko 2) noin 900 ml:aan deionisoitua vettä saostumisen ehkäisemiseksi.

— Lisätään 1,0 ml kantaliuoksia 4, 5, 6, 7 ja 8 (ks. taulukko 3).

— Liuoksen pH:n on oltava 5,5 ± 0,2 (säädetään lisäämällä mahdollisimman vähän NaOH-liuosta tai HCl:a).

— Lisätään vettä, kunnes tilavuus on 1 000 ml.

— Jos kantaliuokset on steriloitu ja niihin on käytetty sopivaa vettä, uutta sterilointia ei tarvita. Jos lopullinen viljelyaine steriloidaan, autoklaavikäsittelyn jälkeen (20 minuuttia 121 °C:ssa) on lisättävä kantaliuosta 8.

Steinbergin (muutetun) viljelyaineen kymmenkertainen väkevöinti väliaikaista varastointia varten

— Lisätään 20 ml kantaliuoksia 1, 2 ja 3 (ks. taulukko 2) noin 30 ml:aan vettä saostumisen ehkäisemiseksi.

— Lisätään 1,0 ml kantaliuoksia 4, 5, 6, 7 ja 8 (ks. taulukko 3). Lisätään vettä, kunnes tilavuus on 100 ml.

— Jos kantaliuokset on steriloitu ja niihin on käytetty sopivaa vettä, uutta sterilointia ei tarvita. Jos lopullinen viljelyaine steriloidaan, autoklaavikäsittelyn jälkeen (20 minuuttia 121 °C:ssa) on lisättävä kantaliuosta 8.

— Viljelyaineen pH:n on (lopullisessa pitoisuudessa) oltava 5,5 ± 0,2.