

## C.20. ROZMNAŻANIE ROZWIELITKI (*Daphnia magna* sp.)

### 1. METODA

#### 1.1. Wprowadzenie

Głównym celem niniejszej metody jest ocena wpływu substancji chemicznych na wydajność rozmnażania *Daphnia magna*.

#### 1.2. Definicje i jednostki

**1. Zwierzęta rodzicielskie:** te samice *Daphnia* obecne na początku testu, których wydajność reprodukcyjna jest celem badań.

**2. Potomstwo:** młode osobniki *Daphnia* wytworzone przez zwierzęta rodzicielskie w czasie testu.

**3. Najniższe stężenie efektywne (LOEC):** najniższe stężenie badanej substancji, w którym obserwuje się statystycznie istotny wpływ substancji na rozmnażanie i śmiertelność osobników rodzicielskich (przy  $p < 0,05$ ) w porównaniu z kontrolą w określonym czasie narażenia. Jednak wszystkie badane stężenia powyżej wartości LOEC muszą mieć szkodliwe skutki w równym lub większym stopniu, niż ten obserwowany w stężeniu LOEC. Gdy te dwa warunki nie mogą być spełnione, należy podać pełne wyjaśnienie, jak wyznaczono wartość LOEC (i stąd NOEC).

**4. Stężenie bez obserwowanego efektu (NOEC):** badane bezpośrednio stężenie poniżej wartości LOEC, które w porównaniu z kontrolą nie ma statystycznie istotnego wpływu ( $p < 0,05$ ) w określonym czasie narażenia.

**5.  $CE_x$ :** stężenie badanej substancji rozpuszczonej w wodzie, które powoduje  $x\%$  redukcję rozrodczości *Daphnia magna* w określonym czasie narażenia.

**6. Szybkość przyrostu:** miara wzrostu populacji, która łączy ze sobą wydajność reprodukcyjną i śmiertelność zależną od wieku<sup>1), 2), 3)</sup>. W populacjach będących w równowadze będzie wynosić zero. W populacjach wzrastających będzie dodatnia, a malejących ujemna. W tym drugim przypadku w końcu prowadzi to do wyginięcia populacji.

**7. Próg detekcji:** najniższe stężenie, które może być wykryte, ale nie ilościowo.

**8. Próg oznaczenia:** najniższe stężenie, które może być oznaczone ilościowo.

**9. Śmiertelność:** zwierzę jest uważane za martwe, gdy jest nieruchome, tj. gdy nie jest w stanie pływać lub jeśli nie porusza przydatkami lub odwłokiem w czasie 15 sekund po delikatnym poruszeniu naczynia testowego (jeżeli stosuje się inną definicję, to musi to zostać podane wraz z odniesieniem do piśmiennictwa).

#### 1.3. Zasada badania

Młode samice *Daphnia* (zwierzęta rodzicielskie), na początku badania młodsze niż 24 godziny, są narażane na badaną substancję dodaną do wody w odpowiednim zakresie stężeń. Czas trwania badania wynosi 21 dni. Pod koniec badania szacuje się całkowitą liczbę żywych młodych osobników przypadających na osobnika rodzicielskiego, który przeżył do końca testu. To oznacza, że osobniki młodociane, które padły podczas badania, nie są brane pod uwagę w obliczeniach. Wydajność reprodukcji zwierząt rodzicielskich może być wyrażona w inny sposób (np. liczba żywego potomstwa przypadająca na osobnika na dzień, od pierwszego dnia, w którym zaobserwowano potomstwo), ale powinno to być podane wraz z całkowitą liczbą młodych wydanych przez rodzica żywego pod koniec badania. Wydajność reprodukcji zwierząt narażanych na badaną substancję jest porównywana z tą z grupy kontrolnej, w celu określenia najniższego stężenia efektywnego (LOEC) oraz stężenia bez obserwowanego efektu (NOEC). Ponadto, o ile jest to możliwe, dane analizuje się przy użyciu modelu regresji, w celu oszacowania stężenia, które spowodowałyby  $x\%$  redukcję w wydajności reprodukcji, tj. wartość  $CE_x$  (np.:  $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  lub  $CE_{10}$ ).

Należy także podać przeżywalność osobników rodzicielskich i czas wytworzenia pierwszego wylęgu. Mogą być badane również inne czynniki związane z substancją, a wpływające na parametry takie, jak wzrost (np. długość) oraz szybkość wzrostu, jeżeli to możliwe.

<sup>1)</sup> Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

<sup>2)</sup> Poole, R.W. (1974). An Introduction to Quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

<sup>3)</sup> Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

#### 1.4. Informacje o badanej substancji

Dostępne powinny być wyniki badania toksyczności ostrej na *Daphnia magna* (metoda: „Toksyczność ostra (dla rozwielitek-*Daphnia sp.*”). Wynik ten może być użyteczny przy wyborze właściwego zakresu stężeń w badaniach rozmnażania. Rozpuszczalność w wodzie oraz prężność par badanej substancji powinny być znane oraz dostępna powinna być także wiarygodna metoda analityczna w celu ilościowego oznaczania tej substancji w roztworach testowych wraz z progami oznaczania i wydajnością odzysku.

Do informacji, które mogą być użyteczne w ustalaniu warunków badanych, zalicza się wzór strukturalny, czystość substancji, trwałość na świetle, trwałość w warunkach testowych, pKa, P<sub>ow</sub> i wyniki badania biodegradacji (Metoda C.4.).

#### 1.5. Ocena wiarygodności badania

Aby badanie było uznane za ważne, następujące kryteria powinny być spełnione w grupie kontrolnej:

- śmiertelność zwierząt rodzicielskich (samice *Daphnia*) nie przekracza 20% pod koniec testu,
- średnia liczba żywych młodych przypadająca na dorosłe przeżywające zwierzę pod koniec testu wynosi  $\geq 60$ .

#### 1.6. Opis metody

##### 1.6.1. Wyposażenie

Naczynia i inne urządzenia, które wchodzi w kontakt z roztworem badanym, powinny być w całości wykonane ze szkła lub innego materiału obojętnego chemicznie. Zwykle naczyniami testowymi są zlewki szklane.

Ponadto wymagany będzie następujący sprzęt:

- tlenomierz (z mikroelektrodą lub inny odpowiedni dla pomiarów tlenu w próbkach o małej objętości),
- odpowiednie wyposażenie do kontroli temperatury,
- pH-metr,
- wyposażenie do oznaczania twardości wody,
- wyposażenie do oznaczania całkowitego węgla organicznego (CWO) w wodzie lub do oznaczania chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT),
- odpowiednie wyposażenie do kontroli czasu oświetlenia i pomiarów natężenia światła.

##### 1.6.2. Badany organizm

Gatunkiem badanym, który ma być stosowany, jest *Daphnia magna* Straus. Stosowane mogą być także inne gatunki *Daphnia* pod warunkiem, że spełniają one stosowne kryteria wiarygodności badania (kryterium wiarygodności odnoszące się do wydajności reprodukcji w kontroli powinno być właściwe dla danego gatunku *Daphnia*). Jeśli stosowany jest inny gatunek *Daphnia*, to musi on być dokładnie opisany, a jego zastosowanie uzasadnione.

Jeśli to możliwe, klon powinien zostać zidentyfikowany na podstawie genotypu. Badania<sup>1)</sup> wykazały, że wydajność reprodukcyjna Klonu A (który pochodził z IRCHA we Francji)<sup>2)</sup> stale spełnia kryterium średniej liczby żywych młodych przypadających na dorosłe przeżywające zwierzę pod koniec testu  $\geq 60$ , jeśli jest hodowany w warunkach opisanych w niniejszej metodzie. Jednakże inne klony są też możliwe do zaakceptowania pod warunkiem, że wykaże się spełnienie kryteriów wiarygodności testu przez tę hodowlę *Daphnia*.

Na początku badania zwierzęta powinny być młodsze niż 24 godziny i nie mogą pochodzić z pierwszego miotu. Powinny one wywodzić się ze zdrowej hodowli (tj. nie wykazywać oznak stresu, takich jak wysoka śmiertelność, obecność samców i efipiów, opóźnienie w wytworzeniu pierwszego miotu, odbarwienie zwierząt itp.). Zwierzęta badane muszą być przetrzymywane w warunkach hodowlanych (światło, temperatura, woda standardowa, karmienie oraz ilość zwierząt na jednostkę objętości) podobnych do tych, jakie mają być

<sup>1)</sup> OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

<sup>2)</sup> Baird, D.J.; Barber, I.; Bradley, M.C.; Soares A.M.V.M. and Calow, P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.

zastosowane w badaniu. Jeżeli woda standardowa, która ma być użyta w teście, jest inna od tej stosowanej w rutynowej hodowli *Daphnia*, to należy do dobrej praktyki przed badaniem zastosować 3 tygodniowy okres aklimatyzacji (tj. jedno pokolenie), aby uniknąć stresu zwierząt rodzicielskich.

### 1.6.3. Woda standardowa

Zaleca się, aby w badaniach stosować w pełni opisaną wodę standardową. To pozwala uniknąć stosowania dodatków (np. wodorosty, wyciąg glebowy itp.), które są trudne do scharakteryzowania, oraz poprawia możliwości standaryzacji między laboratoriami. Odkryto, że dla tego celu odpowiednie są wody Elendt M4<sup>1)</sup> i M7 (rozdział: Analiza całkowitego węgla organicznego (CWO) i wytworzenie nomogramów dla zawartości CWO w karmie glonowej). Jednakże inne rodzaje wody standardowej (np.<sup>2), 3)</sup> są możliwe do zaakceptowania pod warunkiem, że zostanie wykazane spełnienie kryteriów wiarygodności badania przez *Daphnia*.

Jeżeli stosuje się wodę standardową, która zawiera nieokreślone dodatki, to powinny być one jasno określone i w raporcie końcowym powinna być podana informacja co do składu, szczególnie w odniesieniu do zawartości węgla, ponieważ może on wpływać na żywienie. Zaleca się, aby określić całkowitą zawartość węgla organicznego (CWO) i/lub chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT) dodatków organicznych oraz oszacować wpływ na CWO/ChZT stosowanej wody standardowej. Ponadto zaleca się, aby poziom CWO w wodzie standardowej (tj. przed dodaniem glonów) był poniżej wartości 2 mg/dm<sup>3</sup><sup>4)</sup>.

Podczas badania substancji zawierających metale ważne jest, aby mieć na uwadze, że właściwości wody standardowej (np. twardość, możliwość chelatowania) mogą mieć wpływ na toksyczność badanej substancji. Z tego powodu pożądana jest woda w pełni zdefiniowana. Jednakże na dzień dzisiejszy jedynymi w pełni zdefiniowanymi wodami, o których wiadomo, że są odpowiednie dla długotrwałej hodowli *Daphnia*, są Elendt M4 i M7. Obydwie zawierają związek chelatujący EDTA. Prace wykazały<sup>5)</sup>, że „wyraźna toksyczność” kadmu jest ogólnie niższa, gdy badanie rozmnażania jest wykonywane w wodzie M4 i M7, niż w wodach, które nie zawierają EDTA. Z tego powodu M4 i M7 nie są zalecane do badania substancji zawierających metale, a inne wody standardowe zawierające znane związki chelatujące także nie powinny być wykorzystywane. Dla substancji zawierających metale można zastosować inne wody standardowe takie, jak na przykład rekonstruowana woda ASTM<sup>6)</sup>, która nie zawiera EDTA, z dodanym wyciągiem glonów morskich<sup>7)</sup>. To połączenie wody ASTM i wyciągu glonów morskich jest także odpowiednie dla długotrwałej hodowli i badania *Daphnia magna*<sup>8)</sup>, chociaż wciąż wywiera ono niewielki wpływ chelatujący z powodu składnika organicznego w dodanym wyciągu glonów morskich.

Stężenie rozpuszczonego tlenu powinno wynosić powyżej 3 mg/dm<sup>3</sup> na początku i w trakcie badania. Wartość pH powinna zawierać się w zakresie 6,0–9,0 i nie powinna różnić się o więcej niż 1,5 jednostki w jakimkolwiek badaniu. Zalecana jest twardość powyżej 140 mg/dm<sup>3</sup> (jako CaCO<sub>3</sub>). Badania na tym poziomie i wyższym wykazują wydajność reprodukcyjną zgodną z kryteriami ważności<sup>9), 10)</sup>.

<sup>1)</sup> Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

<sup>2)</sup> EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C.I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

<sup>3)</sup> Viganò, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.

<sup>4)</sup> ASTM. (1988) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 20 pp.

<sup>5)</sup> OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Paris 1997.

<sup>6)</sup> ASTM. (1988) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 20 pp.

<sup>7)</sup> Baird, D.J.; Soares A.M.V.M.; Girling, A.; Barber, I.; Bradley M.C. and Calow, P. (1989). The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1<sup>st</sup> European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp. 144-148.

<sup>8)</sup> OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Paris 1997.

<sup>9)</sup> Parkhurst, B.R.; Forte, J.L. and Wright, G.P. (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1-8.

<sup>10)</sup> Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990) The sensitivity of two cladoceran to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185-196.

## ANALIZA CAŁKOWITEGO WĘGLA ORGANICZNEGO (CWO) I WYTWORZENIE NOMOGRAMÓW DLA ZAWARTOŚCI CWO W KARMIE GLONOWEJ

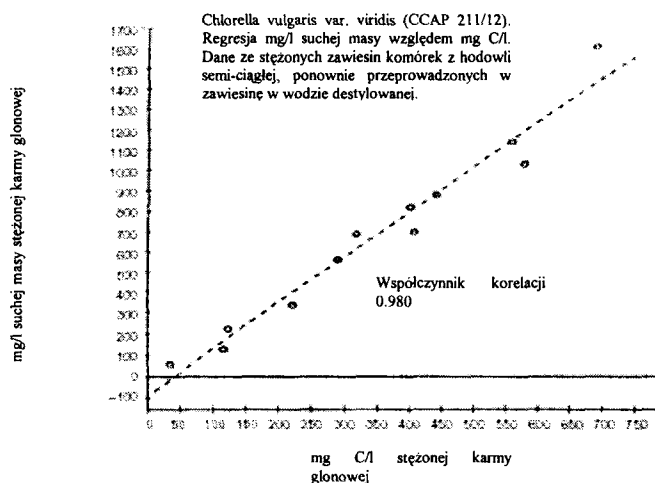
Zawartość węgla organicznego w karmie glonowej nie będzie mierzona bezpośrednio, ale na podstawie korelacji (tj. nomogramów) z miarami surowymi takimi, jak liczba komórek glonów lub absorbancja światła.

CWO powinien być raczej oznaczony metodą oksydacji w wysokiej temperaturze niż metodą UV lub nadsiaczanową.<sup>1)</sup> (Wskazówki w: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

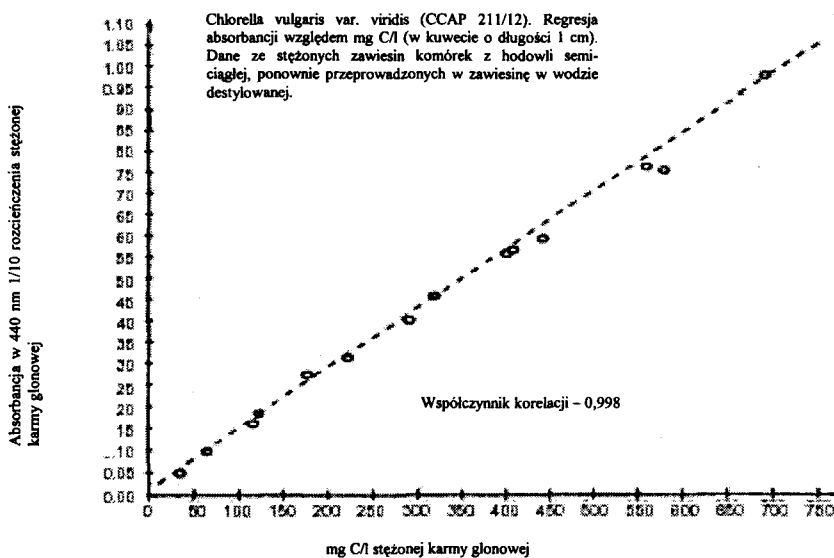
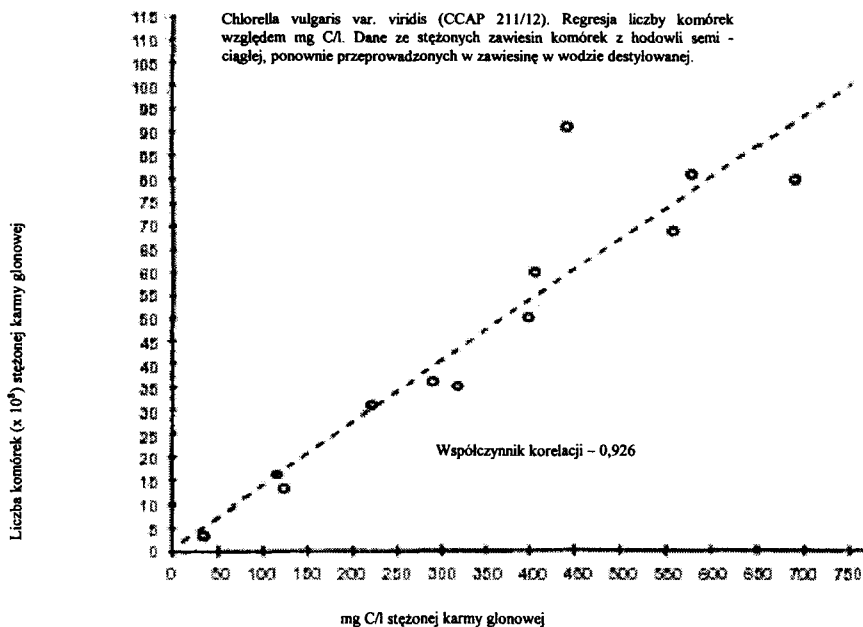
Dla wytworzenia nomogramu glony oddziela się od pożywki wzrostowej przez odwirowanie i ponowne zawieszenie w wodzie destylowanej. Pomiar parametru surowego i stężenia CWO w każdej próbce powinien być dokonany trzykrotnie. Analizowana powinna być także czysta woda destylowana i stężenie CWO wywnioskowane na podstawie próbki glonowej.

Nomogramy powinny być liniowe w wymaganym zakresie stężeń węgla. Przykłady przedstawiono poniżej.

Poniższe nomogramy nie powinny być stosowane do przekształceń; niezbędnym jest, aby laboratoria przygotowały swoje własne nomogramy.



<sup>1)</sup> The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB.



## PRZYGOTOWANIE W PEŁNI ZDEFINIOWANEJ WODY STANDARDOWEJ ELENDT M7 I M4

### Aklimatyzacja do wody standardowej Elendt M7 i M4

Niektóre laboratoria doświadczyły trudności przy bezpośrednim przeniesieniu *Daphnia* do wody M4<sup>1)</sup> i M7. Osiągnięto jednak pozytywne wyniki, gdy zastosowano stopniową aklimatyzację, tj. rozpoczynając od własnej wody, przez 30% wodę Elendt, następnie 60% i w ostatecznie 100% Elendt. Okres aklimatyzacji może wynosić nawet jeden miesiąc.

<sup>1)</sup> OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

## PRZYGOTOWANIE

### Elementy śladowe

Najpierw przygotowywane są oddzielnie roztwory wyjściowe (I) poszczególnych elementów śladowych w wodzie o odpowiedniej czystości, tj. dejonizowanej, destylowanej lub po odwrotnej osmozie. Z tych różnych roztworów wyjściowych (I) przygotowwany jest drugi pojedynczy roztwór wyjściowy (II), który zawiera wszystkie elementy śladowe (roztwór łączony), tj.:

Roztwory wyjściowe (I) (pojedyncza substancja)	Ilość dodana do wody (mg/dm <sup>3</sup> )	Stężenie (w odniesieniu do M4)	Aby przygotować połączony roztwór II, dodaj następującą ilość roztworu I do wody (cm <sup>3</sup> /dm <sup>3</sup> )	
			M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57 190	20 000-krotne	1,0	0,25
MnCl <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O	7 210	20 000-krotne	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-krotne	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-krotne	1,0	0,25
SrCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	3 040	20 000-krotne	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-krotne	1,0	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O	1 260	20 000-krotne	1,0	0,25
CuCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O	335	20 000-krotne	1,0	0,25
ZnCl <sub>2</sub>	260	20 000-krotne	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	200	20 000-krotne	1,0	1,0
KJ	65	20 000-krotne	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	20 000-krotne	1,0	1,0
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	20 000-krotne	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> EDTA*2 H <sub>2</sub> O	5000	2000-krotne	—	—
FeSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	1991	2000-krotne	—	—
Roztwory Na <sub>2</sub> EDTA oraz FeSO <sub>4</sub> są przygotowane oddzielnie, złane razem i natychmiast sterylizowane w autoklawie. To daje:				
2l Fe-EDTA		1000-krotne	20,0	5,0

### Woda M4 i M7

M4 i M7 są przygotowywane przy zastosowaniu roztworu wyjściowego II, makroelementów oraz witamin:

	Ilość dodana do wody (mg/dm <sup>3</sup> )	Stężenie (w odniesieniu do M4)	Ilość roztworu wyjściowego dodana, by przygotować wodę standardową (cm <sup>3</sup> /dm <sup>3</sup> )	
			M4	M7
Roztwór wyjściowy II (połączone elementy śladowe)		20-krotne	50	50
Makroelementy roztworów wyjściowych (pojedyncza substancja)				
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	293 800	1 000-krotne	1,0	1,0
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	246 600	2 000-krotne	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-krotne	0,1	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1 000-krotne	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> × 9 H <sub>2</sub> O	50 000	5 000-krotne	0,2	0,2
NaNO <sub>3</sub>	2 740	10 000-krotne	0,1	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	10 000-krotne	0,1	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	10 000-krotne	0,1	0,1
Łączony roztwór witamin	-	10 000-krotne	0,1	0,1
Połączony roztwór witamin jest przygotowany przez dodanie 3 witamin do 1 litra wody, jak przedstawiono poniżej:				
Wodorochlorek tiaminy	750	10000-krotne	—	—
Cyjanokobalamina (B <sub>12</sub> )	10	10000-krotne	—	—
Biotyna	7,5	10000-krotne	—	—

Połączony roztwór witamin przechowuje się zamrożony w małych porcjach. Witaminy dodaje się tuż przed użyciem wody standardowej.

Aby uniknąć wytrącenia soli podczas przygotowywania wody standardowej, odpowiednie objętości roztworów wyjściowych należy dodać do 500–800 cm<sup>3</sup> wody dejonizowanej, a następnie dopełnić do 1 dm<sup>3</sup>.

Pierwsza publikacja na temat wody M4 znajduje się w Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

#### 1.6.4. Badane roztwory

Badane roztwory w wybranych stężeniach są zazwyczaj przygotowywane przez rozcieńczenie roztworu wyjściowego. Roztwory wyjściowe powinny być przygotowane przez rozpuszczenie substancji w wodzie standardowej.

W niektórych przypadkach wymagane może być zastosowanie rozpuszczalników organicznych lub substancji dyspergujących, w celu utworzenia odpowiednio stężonego roztworu wyjściowego, jednak należy poczynić wszelkie starania, aby uniknąć takich materiałów. Przykładami odpowiednich rozpuszczalników są aceton, etanol, metanol, dimetyloformamid i glikol trójetylenowy. Przykładami odpowiednich dyspergatorów są Cremophor RH40, metyloceluloza (0,01%) oraz HCO-40. W każdym przypadku stężenie badanej substancji w roztworach testowych nie powinno przekraczać progu rozpuszczalności w wodzie standardowej.

Rozpuszczalniki stosuje się w celu wytworzenia roztworu wyjściowego, który może być wprowadzany bezpośrednio do wody. Wymienione rozpuszczalniki nie będą toksyczne i nie będą zwiększały rozpuszczalności substancji w wodzie, jeśli będą podawane w zalecanym końcowym stężeniu rozpuszczalnika w wodzie (tj.  $\leq 0,1 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$ ).

Substancje dyspergujące mogą być pomocne w dokładnym podawaniu roztworów i dyspersji. Wymienione dyspergatory nie będą toksyczne i nie będą zwiększały rozpuszczalności substancji w wodzie, jeśli będą stosowane w zalecanym końcowym stężeniu w wodzie ( $\leq 0,1 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$ ).

### 1.7. Model doświadczenia

Wszelkie działania powinny być wykonywane w naczyniach testowych, a dalsze postępowanie z naczyniami testowymi powinno być wykonywane w kolejności losowej. Zaniechanie takiego postępowania może spowodować odstępstwa, które mogłyby być interpretowane jako wpływ stężenia. W szczególności, jeżeli jednostki doświadczalne są zadawane zgodnie z kolejnością stężeń lub powtórzeń, to wpływy związane z czasem, takie jak zmęczenie operatora lub inne błędy, mogą prowadzić do większych efektów w wyższych stężeniach. Ponadto, jeśli wyniki badania mogą podlegać wpływom warunków początkowych lub środowiskowych, takich jak umiejscowienie w laboratorium, to należy wziąć pod uwagę zblokowanie badania.

### 1.8. Sposób postępowania

#### 1.8.1. Warunki narażenia

##### 1.8.1.1. Czas trwania

Czas trwania badania wynosi 21 dni.

##### 1.8.1.2. Obciążenie

Zwierzęta rodzicielskie są przetrzymywane osobno po jednym na naczynie testowe z 50–100  $\text{cm}^3$  wody standardowej w każdym z nich.

Czasami konieczne mogą być większe objętości, aby sprostać wymogom procedury analitycznej stosowanej do oznaczania stężenia substancji, chociaż dozwolone jest także wykonanie analizy chemicznej w zbiorczej partii powtórzeń. Jeżeli stosowane są objętości większe niż 100  $\text{cm}^3$ , to może zaistnieć konieczność zwiększenia ilości pożywienia dla *Daphnia* tak, aby zapewnić odpowiednią jego dostępność i zgodność z kryteriami wiarygodności. Dla testów przepływowych, z powodów technicznych, pod uwagę mogą być brane inne układy (np. cztery grupy po 10 zwierząt w większej objętości), ale takie zmiany należy przedstawić w raporcie końcowym.

##### 1.8.1.3. Liczba zwierząt

W przypadku testów semistatycznych stosuje się przynajmniej 10 osobników przetrzymywanych pojedynczo dla każdego stężenia i przynajmniej 10 osobników przetrzymywanych pojedynczo w kontroli.

Wykazano, że w przypadku testów przepływowych 40 zwierząt podzielonych na cztery grupy po 10 zwierząt w każdym stężeniu jest odpowiednie<sup>1)</sup>. Mniejsza liczba organizmów badanych może być stosowana, ale

---

<sup>1)</sup> OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

zalecane jest minimum 20 zwierząt na stężenie, podzielonych na dwa lub więcej powtórzeń z równą liczbą zwierząt (np. cztery powtórzenia, każde z pięcioma dafniami). Należy zauważyć, że w badaniach, gdzie zwierzęta są przetrzymywane w grupach, nie będzie możliwe wyrażenie wydajności reprodukcyjnej jako całkowitej liczby żyjących młodych osobników przypadających na żywego osobnika rodzicielskiego pod koniec testu, jeśli osobniki rodzicielskie padną. W tych przypadkach wydajność reprodukcyjna powinna być wyrażona jako „całkowita liczba żyjącego potomstwa wytworzonego przez osobnika rodzicielskiego obecnego na początku testu”.

#### 1.8.1.4. *Karmienie*

W testach semistatycznych karmienie powinno być dokonywane najlepiej codziennie, ale co najmniej trzy razy na tydzień (tj. wraz z wymianą wody standardowej). Odstępstwa od tej procedury (np. dla testów przepływowych) powinny być opisane w raporcie końcowym.

Podczas badania dieta osobników rodzicielskich powinna składać się z żywych komórek następujących glonów: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* (teraz *Pseudokirchneriella subcapitata*<sup>1)</sup>) i *Scenedesmus subspicatus*. Dostarczany pokarm powinien opierać się na ilości węgla organicznego (C) przypadającego na każdego osobnika rodzicielskiego. Badania<sup>2)</sup> wykazały, że dla *Daphnia magna* wystarczające są stężenia pomiędzy 0,1 i 0,2 mg C/*Daphnia*/dzień, aby osiągnąć liczbę potomstwa wymaganą przez kryteria wiarygodności badania. Ta racja może być podawana w stałej ilości przez okres trwania badania lub mniejsza ilość pokarmu stosowana jest na początku i następnie zwiększana podczas doświadczenia, biorąc pod uwagę wzrost osobników rodzicielskich. W tym przypadku ilość pokarmu nadal powinna się zawierać w zalecanym zakresie 0,1–0,2 mg C/*Daphnia*/dzień przez cały czas.

Jeżeli dla ustalenia właściwej ilości pokarmu stosowane są miary zastępcze, takie jak liczba komórek glonów lub absorbcja (dla dogodności, ponieważ pomiar zawartości węgla jest czasochłonny), to każde laboratorium musi stworzyć swój własny nomogram wiążący miarę zastępczą z zawartością węgla w zawieszynie glonów (rozdział: Analiza całkowitego węgla organicznego (CWO) i wytworzenie nomogramów dla zawartości CWO w karmie glonowej). Nomogramy powinny być sprawdzane, co najmniej raz do roku lub częściej, jeśli warunki hodowli glonów uległy zmianie. Stwierdzono, że absorbcja jest lepszą miarą zastępczą dla zawartości węgla niż liczba komórek<sup>3)</sup>.

*Daphnia* powinna być karmiona stężoną zawieszyną glonów, by zmniejszyć objętość pożywki glonów przenoszonych do naczyń doświadczalnych. Stężenie glonów można osiągnąć przez odwirowanie i ponowne przeprowadzenie w zawieszynie w wodzie destylowanej, dejonizowanej lub wodzie standardowej *Daphnia*.

#### 1.8.1.5. *Światło*

16 godzin światła o natężeniu nieprzekraczającym  $15\text{--}20 \mu\text{E}\times\text{m}^{-2}\times\text{s}^{-1}$ .

#### 1.8.1.6. *Temperatura*

Temperatura wody standardowej powinna zawierać się w zakresie 18–22°C. Jednakże w jakimkolwiek doświadczeniu temperatura nie powinna, jeśli to możliwe, różnić się o więcej niż 2°C w obrębie tego zakresu (np. 18–20°C, 19–21°C lub 20–22°C). Właściwym może okazać się dodatkowe naczynie testowe dla celów kontrolowania temperatury.

#### 1.8.1.7. *Napowietrzanie*

Naczynia testowe nie powinny być napowietrzane podczas doświadczenia.

### 1.8.2. *Badane stężenia*

Zazwyczaj stosuje się co najmniej pięć stężeń w ciągu geometrycznym różniących się o współczynnik nieprzekraczający wartości 3,2. Stosowana powinna być właściwa ilość powtórzeń dla każdego badanego

<sup>1)</sup> Korshikov (1990) *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

<sup>2)</sup> Sims, I.R., Watson, S. and Holmes, D. (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

<sup>3)</sup> Sims, I. (1993) Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

stężenia. Jeżeli stosuje się mniej niż pięć stężeń, należy podać uzasadnienie tego faktu. Substancji nie należy testować powyżej jej progu rozpuszczalności w wodzie standardowej.

Ustalając zakres stężeń, należy mieć na uwadze, co następuje:

- 1) jeżeli celem jest uzyskanie wartości LOEC/NOEC, to najniższe stężenie musi być na tyle niskie, aby płodność w tym stężeniu nie była znacząco niższa niż w kontroli. Jeżeli tak nie jest, to doświadczenie będzie musiało być powtórzone z obniżonym najniższym stężeniem;
- 2) jeżeli celem jest otrzymanie wartości LOEC/NOEC, to najwyższe badane stężenie musi być na tyle wysokie, aby płodność w tym stężeniu była znacząco niższa od tej w kontroli. Jeżeli tak nie jest, to doświadczenie będzie musiało być powtórzone z podwyższonym najwyższym stężeniem;
- 3) jeżeli dla rozrodczości szacowana jest wartość  $CE_x$ , to zaleca się, by stosowana była wystarczająca liczba stężeń, aby zdefiniować  $CE_x$  z odpowiednim przedziałem ufności. Jeżeli dla rozrodczości ustalane jest  $CE_{50}$ , to zaleca się, aby najwyższe badane stężenie było większe niż to  $CE_{50}$ . W innym przypadku, chociaż wciąż możliwe będzie oszacowanie  $CE_{50}$ , przedział ufności będzie bardzo szeroki i uniemożliwi zadowalające oszacowanie współmierności dopasowanego modelu;
- 4) w zakres ustalonych stężeń nie powinny wchodzić stężenia, które mają statystycznie istotny wpływ na przeżywalność dorosłych osobników, ponieważ to zmieni istotę testu z badania rozmnażania na połączone testy reprodukcji i śmiertelności wymagające o wiele bardziej złożonej analizy statystycznej.

Wiedza na temat toksyczności badanej substancji (np. z testu ostrego i/lub z badań wstępnych ustalających zakres stężeń) powinna pomóc w wyborze właściwych stężeń badanych.

Tam, gdzie stosuje się rozpuszczalnik lub dyspergator, aby wspomóc wprowadzenie preparatu do roztworów badanych, to jego końcowe stężenie w naczyniach testowych nie powinno być większe niż  $0,1 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$  i powinno być takie samo we wszystkich naczyniach testowych.

#### 1.8.3. Kontrole

Oprócz serii testowej powinna być także prowadzona jedna seria kontrolna w wodzie standardowej, a także jedna seria kontrolna zawierająca rozpuszczalnik lub dyspergator, jeżeli jest stosowany. Rozpuszczalnik lub dyspergator powinien być w takim samym stężeniu jak w naczyniach zawierających badaną substancję. Stosowana powinna być odpowiednia liczba powtórzeń.

W dobrze prowadzonym badaniu, współczynnik zmienności średniej liczby żyjących młodych osobników przypadających na osobnika rodzicielskiego w kontroli/kontrolach powinien wynosić  $\leq 25\%$  i być podawany w raporcie w testach, gdzie zwierzęta przetrzymuje się pojedynczo.

#### 1.8.4. Wymiana badanych roztworów

Częstotliwość wymiany badanych roztworów będzie zależeć od trwałości badanej substancji, ale powinna ona następować przynajmniej trzy razy w tygodniu. Jeżeli ze wstępnych badań trwałości wynika, że stężenie substancji nie jest trwałe (tj. poza zakresem 80–120% nominalnego lub spadające poniżej 80% pomierzonego stężenia początkowego) przez maksymalny okres między wymianami (tj. 3 dni), to należy wziąć pod uwagę częstszą wymianę badanych roztworów lub zastosowanie testu przepływowego.

Gdy w testach semistatycznych wymieniane są badane roztwory, przygotowywana jest druga seria naczyń testowych i osobniki rodzicielskie są do niej przenoszone za pomocą na przykład pipety szklanej o odpowiedniej średnicy. Objętość wody przenoszonej wraz z rozwiłką powinna być zminimalizowana.

#### 1.8.5. Obserwacje

Wyniki obserwacji poczynionych podczas badania powinny być zapisywane na arkuszach danych (rozdziały: Przykładowy arkusz danych dla wymiany roztworów, monitorowania danych fizycznych/chemicznych, karmienia, rozmnażania *Daphnia* oraz śmiertelności dorosłych osobników, Przykładowy arkusz danych do zapisywania wyników analiz chemicznych). Jeśli pożądane są inne pomiary, wymagane mogą być dodatkowe obserwacje.



#### 1.8.6. Potomstwo

Potomstwo wydane przez każde zwierzę rodzicielskie powinno być usuwane i liczone codziennie od momentu pojawienia się pierwszych osobników, aby zapobiec spożywaniu przez nie pokarmu przeznaczonego dla osobników dorosłych. Dla celów niniejszej metody należy liczyć jedynie żyjące potomstwo, jednakże obecność poronionych jaj lub potomstwa martwego także należy zanotować.

#### 1.8.7. Śmiertelność

Śmiertelność wśród osobników rodzicielskich powinna być kontrolowana codziennie, co najmniej w tym samym czasie, co liczenie potomstwa.

#### 1.8.8. Inne parametry

Chociaż niniejsza metoda ma za zadanie oszacować wpływ na rozmnażanie, to możliwym jest, by inne efekty także mogły zostać wystarczająco opisane i poddane analizie statystycznej. Wysoce pożądane są pomiary wzrostu, ponieważ dostarczają one informacji co do możliwych efektów subletalnych, które mogą być bardziej użyteczne niż same pomiary rozrodczości; pod koniec testu zalecany jest pomiar długości osobników rodzicielskich (tj. długość ciała z wyłączeniem kolca analnego). Do innych parametrów, które można zmierzyć lub obliczyć, zalicza się: czas wydania pierwszego potomstwa (i następnych potomków), liczbę i rozmiar potomstwa na zwierzę, liczbę potomstwa poronionego, obecność samców lub efipiów, a także szybkość przyrostu populacji.

#### 1.8.9. Częstotliwość pomiarów i oznaczeń analitycznych

Stężenie tlenu, temperatura, twardość i wartości pH powinny być mierzone co najmniej raz w tygodniu, w starych i świeżych roztworach badanych, w kontroli/kontrolach i najwyższym stężeniu substancji.

Podczas doświadczenia stężenia badanej substancji są oznaczane w regularnych odstępach.

W testach semistatycznych, gdzie należy się spodziewać, że stężenie substancji pozostanie w zakresie  $\pm 20\%$  stężenia nominalnego (tj. w zakresie 80–120%), zaleca się, jako minimum, analizować najwyższe i najniższe stężenia świeżo przygotowane i po zastosowaniu wymiany podczas pierwszego tygodnia testu (tj. analizy powinny być wykonane na próbce z tego samego roztworu świeżo przygotowanego i pierwszego z zastosowaniem wymiany). Te oznaczenia powinny być powtórzone, co najmniej w odstępach tygodniowych.

W przypadku testów, gdzie stężenie badanej substancji może nie pozostać w zakresie  $\pm 20\%$  stężenia nominalnego, konieczne jest analizowanie wszystkich stężeń (świeżo przygotowanych z zastosowaniem wymiany). Jednakże dla tych testów, gdzie zmierzone początkowe stężenie substancji badanej nie znajdowało się w zakresie  $\pm 20\%$  stężenia nominalnego, ale istnieją wystarczające dowody, że te stężenia początkowe są powtarzalne i trwałe (tj. w zakresie 80–120% stężeń początkowych), oznaczenia chemiczne można zredukować w 2 i 3 tygodniu do najwyższego i najniższego stężenia substancji. We wszystkich przypadkach oznaczanie stężeń substancji badanej przed zastosowaniem wymiany muszą być wykonane tylko w jednym powtórzeniu z każdego stężenia.

Jeżeli stosowany jest test przepływowy, to sposób postępowania jest podobny do tego opisanego dla testu semistatycznego (ale pomiar „starych” roztworów w tym przypadku nie jest możliwy do zastosowania). Jednakże doradza się zwiększyć liczbę analiz podczas pierwszego tygodnia (tj. trzy zestawy pomiarów), aby upewnić się, że badane stężenia są trwałe. W tych typach badania powinna być sprawdzana szybkość przepływu substancji badanej i wody standardowej codziennie.

Jeżeli istnieją dowody, że stężenie substancji badanej zostało utrzymane w zakresie  $\pm 20\%$  stężenia nominalnego lub zmierzonego stężenia początkowego podczas doświadczenia, to wyniki mogą opierać się na wartościach nominalnych lub początkowych. Jeżeli odchylenie od stężenia nominalnego lub zmierzonego stężenia początkowego jest większe niż  $\pm 20\%$ , to wyniki powinny być wyrażane jako czasowa średnia ważona (rozdział: Obliczanie średniej ważonej czasowo).

## 2. WYNIKI I SPRAWOZDANIE KOŃCOWE

### 2.1. Analiza wyników

Celem niniejszego badania jest oznaczenie wpływu badanej substancji na całkowitą liczbę żyjącego potomstwa wytworzonego przez żywego pod koniec testu osobnika rodzicielskiego. Dla każdego naczynia testowego (tj. powtórzenia) należy obliczyć całkowitą liczbę potomstwa przypadającą na osobnika rodzicielskiego. Jeżeli w jakimkolwiek powtórzeniu osobnik rodzicielski padnie podczas badania lub też okaże się samcem, to powtórzenie to jest wykluczane z dalszej analizy. Analiza będzie wtedy opierać się na zredukowanej liczbie powtórzeń.

Dla oszacowania wartości LOEC i stąd NOEC, dla wpływów substancji chemicznej na wydajność reprodukcji, koniecznym jest obliczenie średniej wydajności reprodukcji w powtórzeniach dla każdego stężenia i sumaryczne cząstkowe odchylenie standardowe, a można tego dokonać, stosując analizę wariancji (ANOVA). Średnia dla każdego stężenia musi być następnie porównana ze średnią kontroli przy zastosowaniu odpowiedniej metody porównań wielokrotnych. Użyteczne mogą być testy Dunnett'a lub Williams'a<sup>1), 2), 3), 4)</sup>. Konieczne jest sprawdzenie, czy założenie o jednorodności wariancji ANOVA jest spełnione. Zaleca się dokonanie tego raczej w formie graficznej niż za pomocą testu<sup>5)</sup>; alternatywą jest przeprowadzenie testu Bartlett'a. Jeżeli założenie to nie jest spełnione, to należy wziąć pod uwagę transformację danych, tak by ujednolicić wariancję przed wykonaniem ANOVA, lub wykonanie ważonej ANOVA. Należy obliczyć i przedstawić rozmiar wykrywalnego za pomocą ANOVA efektu (tj. najmniejszą znaczącą różnicę).

Dla oszacowania stężenia, które powodowałoby 50% redukcję wydajności reprodukcyjnej (tj.  $CE_{50}$ ), do danych powinna być dopasowana odpowiednia krzywa, taka jak krzywa logistyczna wykreślona przy pomocy metod statystycznych takich, jak metoda najmniejszych kwadratów. Krzywa może być sparametryzowana tak, by wartość  $CE_{50}$  i jej błąd standardowy mogły być oszacowane bezpośrednio. Ułatwiłoby to obliczenia przedziału ufności dla wartości  $CE_{50}$ . Jeżeli nie ma wystarczających powodów, by stosować inny przedział ufności, to stosowany powinien być dwustronny 95% przedział ufności. Procedura dopasowania powinna dostarczyć sposobu do oszacowania znaczenia braku dopasowania. Można tego dokonać graficznie lub dzieląc cząstkową sumę kwadratów na „brak dopasowania” i „składniki błędu” oraz wykonanie testu znaczenia dla braku dopasowania. W związku z tym, że stężenia dające wysoką płodność prawdopodobnie będą miały wyższą wariancję liczby wytworzonych młodych osobników niż te dające niższą płodność, należy uwzględnić znaczenie obserwowanych wartości, aby odzwierciedlić różne wariancje w różnych grupach stężeń. Użyteczne informacje na ten temat można znaleźć w piśmiennictwie<sup>5)</sup>.

Podczas analizy danych w badaniach międzylaboratoryjnych<sup>6)</sup> dopasowano krzywą logistyczną, stosując następujący model (inne modele mogą być również stosowane):

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

gdzie:

- Y – całkowita liczba młodych osobników przypadających na żywego pod koniec testu osobnika rodzicielskiego (obliczona dla każdego naczynia),
- x – stężenie badanej substancji,
- c – spodziewana liczba młodych, gdy  $x=0$ ,
- $x_0$  – wartość  $CE_{50}$  w populacji,
- b – nachylenie.

<sup>1)</sup> Dunnet C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

<sup>2)</sup> Dunnet C.W. (1964) New tables for multiple comparison with control. Biometrics, 20, 482-491.

<sup>3)</sup> Williams D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

<sup>4)</sup> Williams D.A. (1972) The comparison of several dose levels with zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

<sup>5)</sup> Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

<sup>6)</sup> OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Paris 1997.

Ten model będzie prawdopodobnie odpowiedni dla większości sytuacji, ale będą też badania, gdy nie będzie on właściwy. Należy sprawdzić ważność tego modelu, jak proponowano powyżej. W niektórych przypadkach, gdzie niskie stężenia dają efekt wzmożony, właściwym będzie model hormezy<sup>1)</sup>.

Inne stężenia efektywne, takie jak  $CE_{10}$  lub  $CE_{20}$  także mogą być szacowane, chociaż lepszym rozwiązaniem jest zastosowanie innej parametryzacji niż w modelu szacującym wartość  $CE_{50}$ .

## 2.2. Sprawozdanie

W sprawozdaniu zamieszcza się, z uwzględnieniem zakresu badań, następujące informacje:

1) badana substancja:

- postać fizyczna i ważne właściwości fizykochemiczne,
- identyfikacyjne dane chemiczne, włączając czystość;

2) badany gatunek:

- klon (określenie jego genotypu), dostawca lub źródło pochodzenia (jeśli znane) i stosowane warunki hodowli; jeśli do badań stosowany jest gatunek inny niż *Daphnia magna*, należy to podać i usprawiedliwić;

3) warunki badania:

- stosowana procedura badawcza (np. test semistatyczny lub przepływowy, objętość, ilość zwierząt *Daphnia* w litrze),
- czas oświetlenia i natężenie światła,
- układ badania (np. liczba powtórzeń, liczba osobników rodzicielskich przypadająca na powtórzenie),
- szczegóły stosowanej wody standardowej,
- dodatki materiału organicznego, wliczając skład, źródło, metodę przygotowania, CWO/ChZT roztworów wyjściowych, szacunek końcowych CWO/ChZT w roztworach testowych, jeśli stosowano,
- szczegółowe informacje o karmieniu, wliczając ilość (w mg C/*Daphnia*/dzień) i wykaz (np. rodzaj pożywienia, z podaniem gatunku glonów i szczep jeżeli jest znany, warunki hodowli),
- metoda przygotowywania badanych roztworów i częstotliwość wymiany (należy także podać stężenie rozpuszczalnika lub dyspersatora, w przypadku ich stosowania);

4) wyniki:

- wyniki z jakichkolwiek badań wstępnych dotyczące trwałości badanej substancji,
- stężenia nominalne i wyniki wszystkich analiz szacujących stężenie badanej substancji w naczyniach testowych (rozdział: Przykładowy arkusz danych do zapisywania wyników analiz chemicznych); podać należy także próg oznaczania i wydajność odzysku,
- jakość wody w naczyniach doświadczalnych (tj. wartość pH, temperaturę i stężenie rozpuszczonego tlenu, wartość CWO i/lub ChZT oraz twardość tam, gdzie to możliwe) (rozdział: Przykładowy arkusz danych do zapisywania wyników analiz chemicznych),
- kompletny zapis żyjących młodych osobników przypadających na jednego osobnika rodzicielskiego (rozdział: Przykładowy arkusz danych do zapisywania wymiany roztworów, monitorowania danych fizycznych/chemicznych, karmienia, rozmnażania *Daphnia* oraz śmiertelności dorosłych),
- śmiertelność wśród osobników rodzicielskich i dzień, w którym nastąpiła (rozdział: Przykładowy arkusz danych do zapisywania wymiany roztworów, monitorowania danych fizycznych/chemicznych, karmienia, rozmnażania *Daphnia* oraz śmiertelności dorosłych),
- współczynnik zmienności dla płodności w kontroli (oparty na całkowitej liczbie żyjących młodych osobników przypadających na żywego pod koniec testu osobnika rodzicielskiego),
- wykres całkowitej liczby żyjących młodych na żywego pod koniec testu osobnika rodzicielskiego względem stężenia substancji testowej,
- najniższe stężenie efektywne (LOEC) dla reprodukcji, wliczając opis procedur statystycznych i wskazanie, jaki rozmiar efektu mógł być wykryty, oraz stężenie bez efektu dla reprodukcji; tam gdzie właściwe, przedstawić należy także wartości LOEC/NOEC dla śmiertelności osobników rodzicielskich,
- tam gdzie to właściwe, należy przedstawić wartość  $EC_x$  dla reprodukcji wraz z przedziałem ufności i wykresem dopasowanego modelu stosowanego do obliczeń, nachylenie krzywej dawka/odpowiedź i jej odchylenie standardowe,
- inne obserwowane efekty biologiczne lub pomiary: należy przedstawić jakiegokolwiek inne obserwowane lub mierzone efekty biologiczne (np. wzrost osobników rodzicielskich), uwzględniając jakiegokolwiek usprawiedliwienie,
- wyjaśnienia wszelkich odstępstw od niniejszej metody.

<sup>1)</sup> 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.

**PRZYKŁADOWY ARKUSZ DANYCH DO ZAPISYWANIA WYNIKÓW ANALIZ CHEMICZNYCH**

a) Oznaczone stężenia

Stęż. nominalne	Próbka tygodnia 1		Próbka tygodnia 2		Próbka tygodnia 3	
	świeża	stara	świeża	stara	świeża	stara

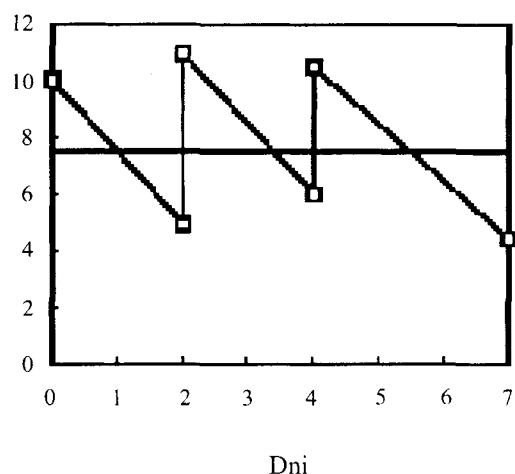
b) Oznaczone stężenia jako procent nominalnego

Stęż. nominalne	Próbka tygodnia 1		Próbka tygodnia 2		Próbka tygodnia 3	
	świeża	stara	świeża	stara	świeża	stara

## OBLICZENIE ŚREDNIEJ WAŻONEJ CZASOWO

### Średnia ważona czasowo

Biorąc pod uwagę, że stężenie badanej substancji może spadać w czasie między wymianami roztworów, koniecznym jest ustalenie, jakie stężenie powinno zostać wybrane jako reprezentatywne dla zakresu stężeń doświadczanych przez rodzicielskie osobniki *Daphnia*. Wybór ten powinien opierać się na założeniach biologicznych i statystycznych. Na przykład, jeśli rozmnażanie podlega największym wpływom przez stężenia szczytowe, to wtedy stosowane powinno być stężenie maksymalne. Natomiast, jeżeli pod uwagę brany jest efekt długoterminowy lub akumulowanie substancji toksycznej i uznany za ważniejszy, to wtedy średnie stężenie ma większe znaczenie. W tym przypadku właściwą średnią do zastosowania jest średnia ważona czasowo, ponieważ bierze ona pod uwagę zmienność chwilowego stężenia w czasie.



**Rysunek 1. Przykład średniej ważonej czasowo**

Rysunek 1 przedstawia przykład (uproszczonego) testu trwającego siedem dni z wymianą roztworów w dniu 0, 2 i 4.

Cienka zygzakowata linia przedstawia stężenie w danym punkcie czasowym. Zakłada się, że spadek stężenia następuje według procesu rozkładu wykładniczego.

Sześć punktów przedstawia obserwowane stężenia zmierzone na początku i na końcu każdego okresu wymiany. Gruba ciągła linia wskazuje pozycję średniej ważonej czasowo.

Średnia ważona czasowo jest obliczana w taki sposób, że powierzchnia pod średnią ważoną czasowo jest równa powierzchni pod krzywą stężenia. Obliczenie powyższego przykładu podano w Tabeli 1.

**TABELA 1. Obliczenie średniej ważonej czasowo**

Wymiana Nr	Dni	Stężenie 0	Stężenie 1	Ln (Stęż. 0)	Ln (Stęż. 1)	Powierzchnia
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Suma dni:	7				Sumaryczna powierzchnia:	50,092
					Średnia ważona czasowo:	7,156

*Dni* są liczbą dni w okresie wymiany.

*Stężenie 0* jest zmierzonym stężeniem na początku każdego okresu wymiany.

*Stężenie 1* jest zmierzonym stężeniem pod koniec każdego okresu wymiany.

*Ln (Stęż. 0)* to logarytm naturalny stężenia 0.

*Ln (Stęż. 1)* to logarytm naturalny stężenia 1.

*Powierzchnia* jest powierzchnią pod krzywą wykładniczą dla każdego okresu wymiany. Oblicza się następująco:

$$\text{Powierzchnia} = \frac{\text{Stęż. } 0 - \text{Stęż. } 1}{\text{Ln}(\text{Stęż. } 0) - \text{Ln}(\text{Stęż. } 1)} \times \text{Dni}$$

Średnia ważona czasowo (Średnia WC) jest sumaryczną powierzchnią podzieloną przez sumę dni.

Dla niniejszego testu ta tabela byłaby przedłużona do 21 dni.

Jeżeli obserwacje czynione są tylko na początku i na końcu okresu wymiany, to nie jest możliwe potwierdzenie, że proces rozkładu przebiega wykładniczo. Inna krzywa spowodowałaby inne wyniki w obliczeniach powierzchni. Jednakże wykładnicza krzywa rozkładu jest godna zaufania i prawdopodobnie jest najlepszą krzywą, jaką można zastosować pod nieobecność innych informacji.

Jeżeli za pomocą analizy chemicznej nie zdoła się oznaczyć jakiegokolwiek substancji pod koniec okresu wymiany, nie jest możliwe ustalenie, jak szybko substancja zanika z roztworu, oraz niemożliwe jest otrzymanie wiarygodnej powierzchni pod krzywą i obliczenie średniej ważonej czasowo.